



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101827610 A

(43) 申请公布日 2010.09.08

(21) 申请号 200880105068.9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008.06.30

A61K 39/395 (2006.01)

(30) 优先权数据

60/946998 2007.06.29 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.03.01

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/068696 2008.06.30

(87) PCT申请的公布数据

W02009/006359 EN 2009.01.08

(71) 申请人 森托科尔奥索生物科技公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 A·达斯 R·斯维特 P·隋

D·贝西 S·吴 J·康 A·贝克

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 刘健 黄可峻

权利要求书 3 页 说明书 97 页

(54) 发明名称

抗 MCP-1 抗体、组合物、方法和用途

(57) 摘要

本发明涉及至少一种具有特异性表位的新型抗 MCP-1 抗体,包括编码至少一种抗 MCP-1 抗体的分离的核酸、MCP-1、载体、宿主细胞、转基因动物或植物,以及制备和使用其的方法,包括治疗组合物、方法和装置。

1. 至少一种分离的哺乳动物 MCP-1 抗体,其包含至少一个可变区,所述可变区包含至少一个重链可变区和至少一条轻链,所述 MCP-1 抗体结合至少一种表位,所述表位包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 4、5、6、7、4-7、4-5、4-6、5-6、5-7、6-7 或 46、47、46-47 或它们的组合中的至少一个。

2. 至少一种分离的哺乳动物 MCP-1 抗体,其包含至少一个可变区,所述可变区包含至少一个重链可变区和至少一条轻链,所述 MCP-1 抗体结合至少一种表位,所述表位包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸 4-7 和 46-47。

3. 根据权利要求 1 所述的至少一种分离的哺乳动物 MCP-1 抗体,其包含至少一个可变区,所述可变区包含至少一个重链可变区和至少一条轻链,所述 MCP-1 抗体包含重链和轻链可变区两者,所述重链和轻链可变区包含 SEQ ID NO:27 和 28。

4. 根据权利要求 1 所述的至少一种分离的哺乳动物 MCP-1 抗体,其包含至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区,所述抗体包含 SEQ ID NO:6、7、9、13、14 和 16 的所有所述重链和轻链互补决定区 (CDR) 氨基酸序列。

5. 根据权利要求 1 所述的至少一种分离的哺乳动物 MCP-1 抗体,其与至少一种分离的包含至少一个可变区的哺乳动物 MCP-1 抗体竞争结合 MCP-1,所述可变区包含至少一条重链和至少一条轻链,所述 MCP-1 抗体包含重链和轻链可变区两者,所述重链和轻链可变区包含 SEQ ID NO:27 和 28。

6. 根据权利要求 1 所述的至少一种分离的哺乳动物 MCP-1 抗体,其与至少一种分离的包含至少一个重链可变区和至少一个轻链可变区的哺乳动物 MCP-1 抗体竞争结合 MCP-1,所述抗体包含 SEQ ID NO:6、7、9、13、14 和 16 的所有所述重链和轻链互补决定区 (CDR) 氨基酸序列。

7. 根据权利要求 1 所述的至少一种分离的哺乳动物 MCP-1 抗体,其特异性结合与包含至少一个重链或轻链 CDR 的抗体相同的 MCP-1 多肽的区域,所述 CDR 具有 SEQ ID NO:6、7、9、13、14 和 16 中至少一个的氨基酸序列。

8. 根据权利要求 1 所述的 MCP-1 抗体,其中所述抗体以选自至少 10^{-9} M、至少 10^{-10} M、至少 10^{-11} M 或至少 10^{-12} M 的至少一种亲和力结合 MCP-1。

9. 根据权利要求 1 所述的 MCP-1 抗体,其中所述抗体基本上调节至少一种 MCP-1 多肽的至少一种活性。

10. 一种分离的核酸,其编码根据权利要求 1 所述的至少一种分离的哺乳动物 MCP-1 抗体。

11. 一种分离的核酸载体,其包含根据权利要求 10 所述的分离的核酸。

12. 一种原核宿主细胞或真核宿主细胞,其包含根据权利要求 10 所述的分离的核酸。

13. 根据权利要求 11 所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是选自 COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、Hep G2、653、SP2/0、293、HeLa、YB2/0、骨髓瘤或淋巴瘤细胞,或它们的任意衍生细胞、无限增殖化细胞或转化细胞中的至少一种。

14. 一种用于制备至少一种 MCP-1 抗体的方法,其包括在体外、体内或原位条件下翻译根据权利要求 10 所述的核酸,使得所述 MCP-1 抗体以可检测或可回收的量表达。

15. 一种组合物,其包含具有至少一个人 CDR 的根据权利要求 1 所述的至少一种分离的哺乳动物 MCP-1 抗体,和至少一种可药用载体或稀释剂。

16. 根据权利要求 15 所述的组合物,其进一步包含至少一种化合物或多肽,所述化合物或多肽选自可检测标记或报道分子、TNF 拮抗剂、抗感染药物、心血管 (CV) 系统药物、中枢神经系统 (CNS) 药物、自主神经系统 (ANS) 药物、呼吸道药物、胃肠 (GI) 道药物、激素药物、用于流体或电解质平衡的药物、血液学药物、抗肿瘤药物、免疫调节药物、眼用药物、耳用药物或鼻用药物、局部用药物、营养产物、细胞因子或细胞因子拮抗剂中的至少一种。

17. 一种抗独特型抗体或片段,其特异性结合根据权利要求 1 所述的至少一种 MCP-1 抗体。

18. 一种用于诊断或治疗细胞、组织、器官或动物中的 MCP-1 相关病症的方法,其包括使组合物与所述细胞、组织、器官或动物接触,或将组合物施用给所述细胞、组织、器官或动物,所述组合物包含有效量的根据权利要求 1 所述的至少一种抗体。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述有效量为每千克所述细胞、组织、器官或动物 0.001-50mg。

20. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述接触或所述施用是通过选自如下的至少一种模式:肠胃外、皮下、肌肉、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、病灶内、快速灌注、阴道、直肠、口腔、舌下、鼻内或经皮。

21. 根据权利要求 18 所述的方法,其进一步包括:在所述 (a) 接触或施用之前、同时或之后,施用至少一种包含有效量的至少一种化合物或多肽的组合物,所述化合物或多肽选自可检测标记或报道分子、抗感染药物、心血管 (CV) 系统药物、中枢神经系统 (CNS) 药物、自主神经系统 (ANS) 药物、呼吸道药物、胃肠 (GI) 道药物、激素药物、用于流体或电解质平衡的药物、血液学药物、抗肿瘤药物、免疫调节药物、眼用药物、耳用药物或鼻用药物、局部用药物、营养药物、细胞因子或细胞因子拮抗剂中的至少一种。

22. 一种医疗装置,其包含根据权利要求 1 所述的至少一种 MCP-1 抗体,其中所述装置适于通过选自如下的至少一种模式接触或施用所述至少一种 MCP-1 抗体:肠胃外、皮下、肌肉、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、病灶内、快速灌注、阴道、直肠、口腔、舌下、鼻内或经皮。

23. 一种用于人药学用途或诊断用途的制品,其包括包装材料和容器,所述容器包含溶液或冻干形式的根据权利要求 1 所述的至少一种 MCP-1 抗体。

24. 权利要求 22 所述的制品,其中所述容器是肠胃外、皮下、肌肉、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、病灶内、快速灌注、阴道、直肠、口腔、舌下、鼻内或经皮递送装置或系统的组件。

25. 一种用于制备根据权利要求 1 所述的至少一种分离的哺乳动物 MCP-1 抗体的方法,其包括提供能够以可回收的量表达所述抗体的宿主细胞或转基因动物或转基因植物或植物细胞。

-
26. 至少一种 MCP-1 抗体,其通过根据权利要求 25 所述的方法制备。
 27. 本文描述的任何发明。

抗 MCP-1 抗体、组合物、方法和用途

背景技术

技术领域

[0001] 本发明涉及对至少一种人单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 蛋白质或其片段的特定表位具有特异性的抗体, 包括特定部分或变体, 以及抗独特型抗体, 和编码此类抗 MCP-1 抗体的核酸、互补核酸、载体、宿主细胞, 以及制备和使用它们的方法, 包括治疗制剂、给药和装置。

[0002] 相关领域

[0003] 人单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) (也称为 CCL-2) 为包含 76 个氨基酸残基的 8.6kDa 蛋白质, 是细胞因子的趋化因子- β (或 C-C) 家族成员。趋化因子是低分子量 (8-10kDa)、诱导型、分泌型、促炎趋化细胞因子, 其已显示在组织损伤位点处特定白细胞亚群的血管周围移行和积聚中起重要作用。取决于 4 个保守半胱氨酸的定位已定义了 2 个主要家族。CXC 或 α -趋化因子主要吸引嗜中性粒细胞, 而 CC 或 β -趋化因子主要吸引单核细胞和除嗜中性粒细胞以外的其他白细胞 (Leonard 和 Yoshimura 等人, 1990)。单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 家族成员形成了趋化因子 C-C 家族的主要组分, 且视为单核细胞、巨噬细胞和活化的淋巴细胞的募集中所涉及的主要趋化因子。考虑来自不同物种的 MCP-1 的同源性, 人和猴 MCP-1 只有 2 个氨基酸不同, 从而显示了 97% 的序列同一性, 而包含 125 个氨基酸残基的 13.8kDa 蛋白质鼠 MCP-1 在分子大小和糖基化程度方面与人 MCP-1 不同。

[0004] 趋化因子受体属于 G 蛋白偶联的、7 跨膜 (7TM) 结构域受体 (GPCR, 也称为蛇形受体) 大家族。基于于 1996 年趋化细胞因子戈登研讨会 (Gordon Research Conference) 确定的受体命名法, 结合 CXC 趋化因子的趋化因子受体被命名为 CXCR, 而结合 CC 趋化因子的受体被命名为 CCR。

[0005] 已知 MCP-1 结合趋化因子受体 CCR2 并通过其进行信号传导。CCR2 是在许多细胞上表达的 7 次跨膜 G 蛋白偶联受体, 这些细胞包括单核细胞、T 细胞、B 细胞和嗜碱粒细胞。已经克隆了两种 MCP-1 特异性受体 (CCR2A 和 CCR2B), 它们响应纳摩尔 (nM) 浓度的 MCP-1 而传递信号。CCR2A (CC-CCR2A) 和 CCR2B (CC-CCR2A) 代表编码具有可变剪接的羧基尾的两种 MCP-1 特异性受体的两种 cDNA。MCP-1 以高亲和力结合这两种亚型, 在表达 CCR2B 的细胞但不在表达 CCR2A 的细胞中诱导钙流动。与表达 CCR2A 的细胞比较, 5 倍小的 MCP-1 可在表达 CCR2B 的细胞中诱导趋化性。

[0006] 与人 MCP-1 具有某些功能和序列同源性的其他蛋白质是已知的。与 MCP-1 (GenBank NP_002973) 尤其相似的是 MCP-2 (GenBank NP_005614) 和嗜酸细胞活化趋化因子 (GenBank P_51671); MCP-2 与 MCP-1 具有 61.8% 的序列同一性, 而嗜酸细胞活化趋化因子-1 与 MCP-1 具有 63.2% 的序列同一性。这些蛋白质在人稳态机制和病理学中的活性和受累谱范围不如对于 MCP-1 同源物那样充分了解。例如, MCP-2 (重新命名为 CCL8) 与 MCP-1 和 MCP-3 (重新命名为 CCL7, Genbank NP_006264) 密切相关, 并且将 CCR1 以及 CCR2B 两者用作其功能性受体。MCP-3 与命名为 D6 的受体结合。MCP-3 还与 CCR10 和 CCR1

结合。MCP-3 蛋白(97 个氨基酸)序列显示与 MCP-1 具有 74% 的同一性,而与 MCP-2 具有 58% 的同源性。分泌型 MCP-3 在 N 糖基化方面与 MCP-1 不同。MCP-4(重新命名为 CCL13, Genbank NP_005399)与三种已知的单核细胞趋化蛋白具有 56-61% 的序列同一性,而与嗜酸细胞活化趋化因子-1 具有 60% 的同一性。MCP-4 的功能似乎与 MCP-3 和嗜酸细胞活化趋化因子的那些功能高度相似。类似 MCP-3, MCP-4 是单核细胞和 T- 淋巴细胞的强效化学引诱物。它对于嗜中性粒细胞是无活性的。在单核细胞上, MCP-4 与识别 MCP-1、MCP-3、RANTES(CCL5) 和嗜酸细胞活化趋化因子的受体(CCR1 和 CCR3 受体)结合,且显示与嗜酸细胞活化趋化因子-1 完全交叉脱敏。MCP-5 是鼠 CC- 趋化因子且与人 MCP-1 最密切相关(66% 的氨基酸同一性)。MCP-5 的基因符号是 SCYA12(重新命名为 CCL12)。用趋化因子受体 CCR2 转染的细胞已显示对 MCP-5 应答。关于细胞因子和趋化因子的一般信息,参见 <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi>, 而关于当前的分类系统,参见 Zlotnik A., Yoshie O. 2000. Chemokines: a new classificationsystem and their role in immunity(趋化因子:一种新的分类系统以及它们在免疫方面的作用). *Immunity* 12:121-127。

[0007] ^{125}I -MCP-1 与单核细胞结合,斯卡查德图分析表明单核细胞具有每个细胞约 1700 个结合位点的最低限度,其 K_d 为 2nM(Yoshimura 和 Leonard, 1990)。用人单核细胞随后进行的平衡结合实验表明,每个细胞存在大约 3000 个结合位点,其 K_d 为 0.77nM(Ernst 等人, 1994)。 ^{125}I -MCP-1 还证明了与表达 CCR2 受体的 dEoL-3 细胞的高亲和力结合,其 K_d 值为 0.4nM(Sarau 等人, 1997),从而证实 MCP-1 与其受体的亚纳摩尔亲和力。为了鉴定 MCP-1 接触其受体 CCR2 的区域,将所有表面暴露的残基用丙氨酸取代。某些残基也突变成其他氨基酸,以鉴定特定位置处的电荷、疏水性或芳香性的重要性。由 35A 疏水沟分开的两个主要碱性残基的簇(R24、K35、K38、K49 和 Y13)使结合水平减少 15-100 倍。数据暗示了这样一个模型,在该模型中 MCP-1 的大的表面积接触受体,许多弱相互作用的累积导致观察到对于野生型(WT)蛋白质有 35pM 的亲和力(Hemmerich 等人, 1999)。文献中从 2nM 下降至 35pM 的亲和力范围可能是由于所使用的测定法和各自测定法的局限性所致。

[0008] 与人 MCP-1 具有某些功能和序列同源性的其他蛋白质是已知的。与 MCP-1(GenBank NP_002973) 尤其相似的是 MCP-2(GenBank NP_005614) 和嗜酸细胞活化趋化因子(GenBank P_51671); MCP-2 与 MCP-1 具有 61.8% 的序列同一性,而嗜酸细胞活化趋化因子-1 与 MCP-1 具有 63.2% 的序列同一性。这些蛋白质在人稳态机制和病理学中的活性和受累谱范围不如对于 MCP-1 同源物那样充分了解。例如, MCP-2 与 MCP-1 和 MCP-3(Genbank NP_006264) 密切相关,并将 CCR1 以及 CCR2B 两者用作其功能性受体。MCP-3 与命名为 D6 的受体结合。MCP-3 还与 CCR10 结合。MCP-3 蛋白(97 个氨基酸)序列显示与 MCP-1 具有 74% 的同一性,而与 MCP-2 具有 58% 的同源性。分泌型 MCP-3 在 N 糖基化方面与 MCP-1 不同。MCP-4(Genbank NP_005399)与三种已知的单核细胞趋化蛋白具有 56-61% 的序列同一性,而与嗜酸细胞活化趋化因子-1 具有 60% 的同一性。MCP-4 的功能似乎与 MCP-3 和嗜酸细胞活化趋化因子的那些功能高度相似。类似 MCP-3, MCP-4 是单核细胞和 T- 淋巴细胞的强效化学引诱物。它对于嗜中性粒细胞是无活性的。在单核细胞上, MCP-4 与识别 MCP-1、MCP-3 和 RANTES(CCR2) 的受体结合。在嗜酸性粒细胞上, MCP-4 具有与 MCP-3、RANTES 和嗜酸细胞活化趋化因子相似的功效和效力。MCP-4 与嗜酸细胞活化趋化因子共有受体(CCR1 和 CCR3),且显示与嗜酸细胞活化趋化因子-1 完全交叉脱敏。

[0009] 能结合 MCP-1 的其他抗体已有报道:JP9067399 公开了从分离的血细胞获得的抗体,而 JP05276986 公开了分泌 IgM 抗人 MCP-1 的杂交瘤。最近,公开了能结合多个 β -趋化因子(包括 MCP-1)的抗体(W003048083)以及还结合嗜酸细胞活化趋化因子的 MCP-1 结合抗体(US20040047860)。

[0010] 因此,需要提供对人 MCP-1 具有特异性的人抗体,以在治疗中使用,来减少或消除 MCP-1 依赖性疾病的症状,以及获得优于已知抗体或其片段的改善。

发明内容

[0011] 本发明提供了分离的人、灵长类动物、啮齿类动物、哺乳动物、嵌合、人源化和/或 CDR-移植的表位特异性抗 MCP-1 抗体及其他免疫球蛋白衍生蛋白质、片段、裂解产物和其他特定部分及其变体,以及表位特异性抗 MCP-1 抗体组合物、编码核酸或互补核酸、载体、宿主细胞、组合物、制剂、装置、转基因动物、转基因植物,以及制备和使用其的方法,如本文结合本领域已知的进行描述和使得可行的。除了如本文所述的本发明抗体组合物之外,本发明的抗体由其对 MCP-1 的亲合力、对人 MCP-1 的特异性和阻断人 MCP-1 的生物活性的能力限定。

[0012] 本发明还提供了至少一种分离的抗 MCP-1 抗体,例如但不限于至少一种抗体、抗体融合蛋白或片段,如本文所述的。根据本发明的抗体包括任意包含这样的分子的蛋白质或肽,所述分子包含免疫球蛋白分子的至少一部分,例如但不限于,至少一个配体结合结构域,例如但不限于,如表 4A、4B、4D 和 4E(SEQ ID NO:6-26)中提供且任选与构架区(例如,表 4C(SEQ ID NO:2-5)中描述的 FR1、FR2、FR3、FR4 或其片段)功能性结合的重链或轻链可变区、重链或轻链的互补决定区(CDR)或其配体结合部分;还任选至少包含人免疫球蛋白的 CH1、铰链、CH2 或 CH3。至少一种抗体氨基酸序列可进一步任选包含如本文所述或本领域已知的至少一种特定置换、插入或缺失。

[0013] 在实施例中,抗体的配体结合部分包含 SEQ ID NO:27 和 28。在一个方面,本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体,其包含至少一个包含 SEQ ID NO:27 或 28 的可变区。

[0014] 在另一方面,本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体,其包含(i)ID NO:6、7 和 9 的所有重链互补决定区(CDR)氨基酸序列;或(ii)SEQ ID NO:13、14 和 16 的所有轻链 CDR 氨基酸序列。

[0015] 在一个方面,本发明提供了包含编码特异性抗 MCP-1 抗体的多核苷酸、与该多核苷酸互补或杂交的分离的核酸分子,其包含至少一种特定的序列、结构域、部分或其变体。本发明还提供了包含所述抗 MCP-1 抗体核酸分子的重组载体,包含此类核酸和/或重组载体的宿主细胞,以及制备和/或使用此类抗体核酸、载体和/或宿主细胞的方法。

[0016] 本发明的至少一种抗体可结合至少一种特定表位,该特定表位是至少一种 MCP-1 蛋白或变体或衍生物如 SEQ ID NO:1 中提供的那些是特异性的。所述至少一种表位可包含至少一个包括所述蛋白质的至少一部分的抗体结合区域,所述表位优选由其至少一部分的至少 1-5 个氨基酸构成,例如但不限于,所述蛋白质的至少一个功能性结构域、细胞外结构域、可溶性结构域、亲水性结构域、外部结构域或细胞质结构域,或其任何部分。特别是,本发明可包括抗体或抗体片段,其可以特异性结合或竞争性结合这样的残基,该残基包含 SEQ

ID NO:1 的 4-7 和 46-47 的至少 2 个氨基酸,例如但不限于,SEQ ID NO:1 的氨基酸 4-7 或 46-47 的至少 2 个氨基酸、SEQ ID NO:1 的氨基酸 4、5、6、7、4-7、4-5、4-6、5-6、5-7、6-7 或 46、47、46-47 或其任意组合中的至少一个。

[0017] 所述至少一种抗体可以任选包含如 SEQ ID NO:6、7、9、13、14 和 16 提供的至少一个互补决定区 (CDR) (例如分别如 SEQ ID No:27 和 28 提供的重链或轻链可变区的 CDR1、CDR2 或 CDR3) 的至少一个特定部分;并且任选进一步包含至少一个恒定或可变构架区或其任何部分,其中所述抗体阻断、抑制或阻止至少一种活性,例如但不限于,MCP-1 与细胞表面上的受体结合、CCR2 受体内化、MCP-1 刺激的 Ca^{2+} 动员或任何其他合适的已知 MCP-1 测定。因此可以根据已知方法针对相应活性筛选抗 MCP-1 抗体,例如但不限于,对 MCP-1 蛋白的至少一种生物活性。

[0018] 本发明进一步提供了针对本发明的至少一种 MCP-1 抗体的至少一种 MCP-1 抗独特型抗体。抗独特型抗体包括任何包含这样的分子的蛋白质或肽,所述分子包含免疫球蛋白分子的至少一部分,例如但不限于,至少一个配体结合部分 (LBP),例如但不限于,重链或轻链的互补决定区 (CDR),或其配体结合部分,重链或轻链可变区,重链或轻链恒定区,构架区,或其任何部分,它们可以整合进本发明的抗独特型抗体内。本发明的抗独特型抗体可包括或来源于任何哺乳动物,例如但不限于,人、小鼠、兔、大鼠、啮齿类动物、灵长类动物等。

[0019] 在一个方面,本发明提供了包含编码至少一种 MCP-1 抗独特型抗体的多核苷酸、与该多核苷酸互补或杂交的分离的核酸分子,其包含至少一种特定的序列、结构域、部分或其变体。本发明进一步提供了包含所述 MCP-1 抗独特型抗体编码核酸分子的重组载体,包含此类核酸和 / 或重组载体的宿主细胞,以及制备和 / 或使用此类抗独特型抗体核酸、载体和 / 或宿主细胞的方法。

[0020] 本发明还提供了至少一种用于在宿主细胞中表达至少一种抗 MCP-1 抗体或 MCP-1 抗独特型抗体的方法,其包括如本文所述在其中至少一种抗 MCP-1 抗体以可检测和 / 或可回收的量表达的条件下培养宿主细胞。

[0021] 本发明还提供了至少一种组合物,其包含 (a) 如本文所述的分离的抗 MCP-1 抗体编码核酸和 / 或抗体;和 (b) 合适的载体或稀释剂。根据已知载体或稀释剂,载体或稀释剂可以任选为可药用的。组合物可以任选进一步包含至少一种另外的化合物、蛋白质或组合物。

[0022] 本发明还提供了至少一种抗 MCP-1 抗体方法或组合物,如本领域已知的和 / 或如本文所述的,其用于在细胞、组织、器官、动物或患者中和 / 或在相关病症发展之前、之后或期间施用治疗有效量以调节或治疗至少一种 MCP-1 相关病症。

[0023] 本发明还提供了至少一种递送治疗或预防有效量的至少一种根据本发明的抗 MCP-1 抗体的组合物、装置和 / 或方法。

[0024] 本发明进一步提供了至少一种抗 MCP-1 抗体方法或组合物,如本领域已知的和 / 或如本文所述的,其用于在细胞、组织、器官、动物或患者中和 / 或在相关病症发展之前、之后或期间诊断至少一种 MCP-1 相关病症。

[0025] 本发明还提供了递送根据本发明的至少一种抗 MCP-1 抗体 (用于诊断) 的至少一种组合物、装置和 / 或方法。

[0026] 在一个方面,本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体,其包含至少

一个包含 SEQ ID NO :27 或 28 的可变区。

[0027] 在另一方面,本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体,其包含 (i) SEQ ID NO :6、7 和 8 或 9 的所有重链互补决定区 (CDR) 氨基酸序列;或 (ii) SEQ ID NO :13、14 和 15 或 16 的所有轻链 CDR 氨基酸序列。

[0028] 在另一方面,本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体,其包含 (i) SEQ ID NO :6、7 和 8 或 9 的所有重链互补决定区 (CDR) 氨基酸序列;或 (ii) SEQ ID NO :13、14 和 15 或 16 的所有轻链 CDR 氨基酸序列中的至少一个。

[0029] 所述至少一种抗体还可以任选具有至少一种下列性质:以选自至少 10^{-9} M、至少 10^{-10} M、至少 10^{-11} M 或至少 10^{-12} M 中的至少一个的亲和力结合 MCP-1;基本上中和至少一种 MCP-1 蛋白质的至少一种活性。还提供的是编码至少一种分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体的分离的核酸;包含分离的核酸的分离的核酸载体,和/或包含分离的核酸的原核或真核宿主细胞。宿主细胞可以任选为选自 NOS、COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、Hep G2、YB2/0、SP2/0、HeLa、骨髓瘤或淋巴瘤细胞或其任何衍生细胞、无限增殖化细胞或转化细胞的至少一种。还提供的是生产至少一种抗 MCP-1 抗体的方法,其包括在体外、体内或原位条件下翻译抗体编码核酸,使得 MCP-1 抗体以可检测或可回收的量表达。

[0030] 还提供的是包含至少一种分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体和至少一种可药用载体或稀释剂的组合物。

[0031] 还提供的是用于诊断或治疗细胞、组织、器官或动物中的 MCP-1 相关病症的方法,其包括 (a) 使组合物与细胞、组织、器官或动物接触,或给细胞、组织、器官或动物施用组合物,所述组合物包含有效量的至少一种本发明的分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体。

[0032] 还提供的是包含至少一种本发明的分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体的医疗装置,其中所述装置适用于经由选自如下的至少一种方式接触或施用至少一种抗 MCP-1 抗体:肠胃外、皮下、肌肉内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内 (intracerebellar)、脑室内、结肠内、颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、病灶内、快速灌注 (bolus)、阴道、直肠、口腔、舌下、鼻内或透皮。

[0033] 还提供的是用于人药物或诊断用途的制品,其包含包装材料和容器,后者包含溶液、颗粒或冷干形式的至少一种本发明的分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体。

[0034] 还提供的是用于生产至少一种本发明的分离的哺乳动物抗 MCP-1 抗体的方法,其包括提供能够表达可回收量的抗体的宿主细胞或转基因动物或转基因植物或植物细胞。本发明还提供了至少一种由上述方法生产的抗 MCP-1 抗体。

[0035] 本发明进一步提供了本文描述的任何发明。

[0036] 序列表简述

[0037] SEQ ID

[0038] NO 描述

[0039] 1 用于选择抗 MCP-1 结合剂的人 MCP-1 (CCL2) 和变体

[0040] 2 VH1A 重链可变序列:FR1、CDR1、FR2、CDR2 变体、FR3、CDR3、FR4

[0041] 3 VH3 重链可变序列:FR1、CDR1、FR2、CDR2 变体、FR3、CDR3、FR4

[0042] 4 κ 3 轻链可变序列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 变体、FR4

[0043]	5	λ 3 轻链可变序列 :FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 变体、FR4
[0044]	6	VH1A CDR1 所有 MOR03471
[0045]	7	VH1A CDR2 3781、3790、CNT0 888
[0046]	8	VH1A CDR2 3899
[0047]	9	VH1A CDR3 所有 MOR03471
[0048]	10	VH3 CDR1 所有 MOR03548
[0049]	11	VH3 CDR2 3744、3747
[0050]	12	VH3 CDR3 所有 MOR03548
[0051]	13	κ 3CDR1 所有 MOR03471
[0052]	14	κ 3CDR2 所有 MOR03471
[0053]	15	κ 3 CDR3 3781
[0054]	16	κ 3 CDR3 3790、CNT0888
[0055]	17	κ 3 CDR3 3899
[0056]	18	λ 3 CDR1 所有 MOR03548
[0057]	19	λ 3 CDR2 所有 MOR03548
[0058]	20	λ 3 CDR3 3744
[0059]	21	λ 3 CDR3 3747
[0060]	22	VH1A CDR2 变体
[0061]	23	VH3 CDR2 变体
[0062]	24	Lk CDR3 变体
[0063]	25	Lλ CDR3 变体
[0064]	26	HC CDR1 变体
[0065]	27	CNT0888 重链可变区
[0066]	28	CNT0888 轻链可变区

具体实施方式

[0067] 本发明提供了至少一种纯化的、分离的、重组的和 / 或合成的抗 MCP-1 人、灵长类动物、啮齿类动物、哺乳动物、嵌合、人源化、工程化的或 CDR 移植抗体和针对所述抗体的 MCP-1 抗独特型抗体,以及包含至少一种多核苷酸的组合物和编码核酸分子,所述多核苷酸编码至少一种抗 MCP-1 抗体或抗独特型抗体。本发明还包括但不限于,制备和使用此类核酸和抗体及抗独特型抗体的方法,包括诊断和治疗组合物、方法和装置。

[0068] 引用:本文引用的所有出版物或专利都以引用方式全文并入本文中,因为它们显示了本发明时的技术发展水平,和 / 或提供了本发明的描述和实现。出版物指任何科学出版物或专利出版物,或可以任何媒介形式获得的任何其他信息,包括所有记录形式、电子形式或印刷形式。下列参考文献以引用方式全文并入本文中:Ausubel 等人(编辑),Current Protocols inMolecular Biology,John Wiley & Sons,Inc.,NY,NY(1987-2004);Sambrook 等人,Molecular Cloning :A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor,NY(1989); Harlow 和 Lane,antibodies,aLaboratory Manual,Cold Spring Harbor,NY(1989); Colligan 等人(编辑),Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc.,

NY(1994-2004);Colligan 等人, Current Protocols in ProteinScience, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2004)。

[0069] 缩写

[0070] aa:氨基酸;BSA:牛血清清蛋白;CDR:互补决定区;ECL:电化学发光;HuCAL[®]:人组合抗体文库;HSA:人血清清蛋白;MCP-1:单核细胞趋化蛋白-1;Ig:免疫球蛋白;IPTG:异丙基 β -D-硫代半乳糖苷;mAb:单克隆抗体;PBS:磷酸盐缓冲盐水,pH 7.4;SET:溶液平衡滴定;VH:免疫球蛋白重链可变区;VL:免疫球蛋白轻链可变区;

[0071] 定义

[0072] 如本文使用,“抗 CCL2 抗体”、“抗 MCP-1 抗体”、“抗 MCP-1 抗体部分”或“抗 MCP-1 抗体片段”和 / 或“抗 MCP-1 抗体变体”等包括包含这样的分子的任何蛋白质或肽,所述分子包含免疫球蛋白分子的至少一部分,例如但不限于,重链或轻链的至少一个互补决定区(CDR)或其配体结合部分、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、构架区,或其任何部分,或 MCP-1 受体或结合蛋白的至少一部分,它们可以整合进本发明抗体内。此类抗体还任选影响特定配体,例如但不限于其中此类抗体体外、原位和 / 或体内调节、减少、增加、拮抗、激动(angonize)、缓和、减轻(alleviates)、阻断、抑制、消除和 / 或干扰至少一种 MCP-1 活性或结合,或 MCP-1 受体活性或结合。作为非限制性实例,本发明的合适的抗 MCP-1 抗体、特定部分或变体可以结合至少一种 MCP-1 或其特定部分、变体或结构域。

[0073] 如本文所用,“表位”指能够与抗体特异性结合的蛋白质的片段或特征。表位通常由分子的化学活性表面基团例如氨基酸或糖侧链组成,且通常具有特定的三维结构特征,以及比电荷特征。构象表位和非构象表位的区别在于与前者而不是后者的结合在变性溶剂存在的情况下会丧失。包括由 MCP-1 分子的构象折叠产生的蛋白质表位,所述蛋白质表位在来自 MCP-1 分子线性序列的不同部分的氨基酸在 3 维空间中以紧密接近性集合时出现。

[0074] “MCP-1”意指在 NCBI 记录登记号 NP_002973 中参考的 76 个氨基酸的序列,且名称不一地称为 MCP(单核细胞趋化蛋白)、SMC-CF(平滑肌细胞趋化因子)、LDCF(淋巴细胞衍生趋化因子)、GDCF(神经胶质瘤衍生单核细胞趋化因子)、TDCF(肿瘤衍生趋化因子)、HC11(人细胞因子 11)、MCAF(单核细胞趋化及活化因子)。基因符号是 SCYA2,在人染色体 17 上的 JE 基因,且新名称是 CCL2(Zlotnik, Yoshie 2000. Immunity 12:121-127)。JE 是人 MCP-1/CCL2 的小鼠同源物。

[0075] 如本文所用,术语“人抗体”指其中基本上蛋白质的每个部分(例如 C_L、C_H 结构域(例如 C_H1、C_H2、C_H3)、铰链、(V_L, V_H))都来源于人种系免疫球蛋白基因序列的重组事件或来自成熟人抗体序列的抗体。除了从人分离的抗体以外,此类人抗体可以通过用人免疫球蛋白种系基因免疫能够发动免疫应答的转基因小鼠来获得(Lonberg 等人, Int Rev Immunol 13(1):65-93(1995)和 Fishwald 等人, Nat Biotechnol 14(7):845-851(1996)),或可以如本文所述选自人抗体谱文库。此类人基因序列的来源可以在任何合适的文库中找到,例如 VBASE, 人抗体基因(<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc>)或其翻译产物数据库,或在 <http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/> 上,它给出了基于其氨基酸相似性分类成组的人抗体。在该定义范围内的是复合抗体或人复合抗体的功能片段,其包括来自一种或多种人抗体序列的构架区和来自两种不同的人或非人来源的 CDR 区。在“人抗体”定义内的是复合抗体或人复合抗体的功能片段,其包括来自种系和重排人抗体序列的构架区和

来自 2 种不同来源抗体的 CDR 区。根据本公开的人复合抗体或人复合抗体的功能片段包括来自一种或多种人抗体序列的构架区,和来源于人或非人抗体序列的 CDR 区,或可以是完全合成的。因此,人抗体不同于嵌合抗体或人源化抗体。应当指出的是,人抗体可以由能够表达功能性重排的人免疫球蛋白(例如重链和/或轻链)基因的非人动物或原核或真核细胞产生。此外,当人抗体是单链抗体时,它可包含在天然人抗体中不存在的连接肽。例如,Fv 可包含连接重链可变区和轻链可变区的连接肽,例如 2 至约 8 个甘氨酸或其他氨基酸残基。此类连接肽被认为是人源的。

[0076] “人源化”形式的非人(例如鼠)抗体是具有来源于非人免疫球蛋白的基本上置换的序列部分的嵌合抗体。在很大程度上,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中受体的 CDR(互补决定区,其也称为高变区)残基由具有所需特异性、亲和力和能力的来自非人物种(供体抗体)例如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的 CDR 残基置换。在某些情况下,人免疫球蛋白的构架区(FR)残基由相应的非人残基置换。此外,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中不存在的残基。进行这些修饰以进一步改善抗体性能。一般而言,人源化抗体将包含基本上所有至少一个,且一般是 2 个可变结构域,其中所有或基本上所有的高变区对应非人免疫球蛋白的那些,且所有或基本上所有的 FR 是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体还可任选包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人 IgG 免疫球蛋白的恒定区的至少一部分。关于更多的细节,参见 Jones 等人, *Nature* 321:522-525(1986); Reichmann 等人, *Nature* 332:323-329(1988); 和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596(1992)。

[0077] 如本文所用,抗体的 K_d 指抗体对预定抗原的解离常数 K_d ,并且是抗体对特定靶的亲和力的测量。高亲和力抗体对预定抗原的 K_d 为 $10^{-8}M$ 或更低,更优选 $10^{-9}M$ 或更低,并且更优选 $10^{-10}M$ 或更低。如本文所用,术语“ K_{dis} ”或“ K_d ”或“ K_d ”意指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。“ K_d ”是解离速率(k_2 ,也称为“解离率(off-rate) (k_{off})”)与结合速率(k_1)或“结合率(on-rate) (k_{on})”的比率。因此, K_d 等于 k_2/k_1 或 k_{off}/k_{on} 且表示为摩尔浓度(M)。它遵循下列原则,即 K_d 越小,结合越强。因此与 $10^{-9}M$ (或 1nM)相比较, $10^{-6}M$ (或 1 微摩尔)的 K_d 表明为弱结合。

[0078] 如本文所用,术语“对... 特异”和“特异性结合”和“特异地结合”指抗体以比其他抗原或蛋白质更大的亲和力与预定抗原结合。通常,抗体以 $10^{-7}M$ 或更小的解离常数(K_d)结合,并且与预定抗原结合的 K_d 为其与除预定抗原以外的非特异性抗原(例如 BSA、酪蛋白或任何其他特定多肽)结合的 K_d 的至少 1/2。短语“识别抗原的抗体”和“对抗原特异的抗体”在本文中可与术语“与抗原特异性结合的抗体”或“抗原特异性抗体”例如 MCP-1 特异性抗体互换使用。

[0079] 1. 本发明抗体的制备

[0080] 对人 MCP-1 蛋白质或其片段,例如分离的和/或 MCP-1 蛋白质或其部分(包括成分分子,例如合成肽)具有特异性的人抗体的制备可以用本领域已知的任何合适技术来进行。人抗体可以用本领域已知的多种技术产生。在一个实施例中,人抗体选自噬菌体文库,其中那种噬菌体文库表达人抗体(Vaughan et al. *Nature Biotechnology* 14:309-314(1996); Sheets 等人, *PITAS(USA)* 95:6157-6162(1998); Hoogenboom 和 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381(1991); Marks 等人, *J. Mol. Biol.*, 222:581(1991))。

[0081] 人抗体还可以通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物,例如其中内源性免疫球蛋白基因已被部分或全部灭活的小鼠内来制备。例如,可以用人 MCP-1 或其片段使包含功能性重排的人免疫球蛋白重链转基因,以及包含来自可以经历功能性重排的人免疫球蛋白轻链基因座的 DNA 的转基因的转基因小鼠免疫来引发抗体的产生。如果需要,抗体产生细胞可以被分离,并且杂交瘤或其他无限增殖化的抗体产生细胞可以如本文所述和 / 或如本领域已知的进行制备。或者,抗体、特定部分或变体可以利用编码核酸或其部分在合适的宿主细胞中表达。

[0082] 用合适抗原攻击后,观察到人抗体产生,所述人抗体在所有方面(包括基因重排、装配和抗体谱)都非常类似于在人中可见的那种。这种方法在(例如)美国专利 No. 5,545,807、No. 5,545,806、No. 5,569,825、No. 5,625,126、No. 5,633,425、No. 5,661,016,以及下列科学出版物中有描述: Marks 等人, *Bio/Technology* 10: 779-783(1992); Lonberg 等人, *Nature* 368: 856-859(1994); Morrison, *Nature* 368: 812-13(1994); Fishwild 等人, *Nature Biotechnology* 14: 845-51(1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826(1996); Lonberg 和 Huezar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93(1995)。或者,人抗体可以经由产生针对靶抗原的抗体的人 B 淋巴细胞(此类 B 淋巴细胞可以从个体中回收或可以已在体外进行免疫)的无限增殖化来进行制备。参见,例如 Cole 等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77(1985); Boerner 等人, *J. Immunol.*, 147(1): 86-95(1991); 以及美国专利 No. 5,750,373。抗体产生细胞还可以从人或其他合适动物的外周血,或优选脾或淋巴结获得,所述人或其他合适动物已用目的抗原进行免疫。任何其他合适的宿主细胞还可以用于表达编码本发明抗体、其特定片段或变体的异源或内源核酸。融合细胞(杂交瘤)或重组细胞可以使用选择性培养条件或其他合适的已知方法进行分离,并且可通过有限稀释或细胞分选或其他已知方法进行克隆。产生具有所需特异性的抗体的细胞可以通过合适的测定(例如 ELISA)进行选择。

[0083] 在一种方法中,杂交瘤通过使合适的无限增殖细胞系(例如骨髓瘤细胞系,例如但不限于, Sp2/0、Sp2/0-AG14、NS0、NS1、NS2、AE-1、L. 5、> 243、P3X63Ag8.653、Sp2 SA3、Sp2 MA1、Sp2 SS1、Sp2 SA5、U937、MLA144、ACT IV、MOLT4、DA-1、JURKAT、WEHI、K-562、COS、RAJI、NIH3T3、HL-60、MLA 144、NAMAIWA、NEURO 2A 等,或异型骨髓瘤(heteromylomas),其融合产物,或由其衍生的任何细胞或融合细胞,或如本领域已知的任何其他合适的细胞系,参见,例如 www.atcc.org, www.lifetech.com 等)与抗体产生细胞融合来产生,所述抗体产生细胞例如(但不限于)为分离或克隆的脾、外周血、淋巴、扁桃体或其他免疫或包含 B 细胞的细胞,或任何其他细胞,它们表达重链或轻链恒定或可变或构架或 CDR 序列,作为内源或异源核酸,作为重组或内源的、病毒、细菌、藻类、原核生物、两栖动物、昆虫、爬行动物、鱼、哺乳动物、啮齿类动物、马、绵羊、山羊、羊、灵长类动物、真核生物、基因组 DNA、cDNA、rDNA、线粒体 DNA 或 RNA、叶绿体 DNA 或 RNA、hnRNA、mRNA、tRNA、单链、双链或三链的、杂交的等或其任意组合。参见,例如以引用方式全文并入本文中的 Ausubel,同上,和 Colligan, *Immunology*, 同上,第 2 章。

[0084] 与人 MCP-1 结合且包含限定的重链或轻链可变区的人抗体可以使用合适方法如噬菌体展示(Katsube, Y. 等人, *Int J Mol. Med*, 1(5): 863-868(1998))进行制备。可以使用产生或分离具有所需特异性的抗体的其他合适方法,包括但不限于从肽或蛋白质文库

中选择重组抗体的方法（例如但不限于，噬菌体、核糖体、寡核苷酸、RNA、cDNA 等展示文库；例如，如可从如下机构获得的：Cambridge antibody Technologies, Cambridgeshire, UK；MorphoSys, Martinsreid/Planegg, DE；Biovation, Aberdeen, Scotland, UK；BioInvent, Lund, Sweden；Dyax Corp., Enzon, Affymax/Biosite；Xoma, Berkeley, CA；Ixsys。参见，例如 EP368,684、PCT/GB91/01134、PCT/GB92/01755、PCT/GB92/002240、PCT/GB92/00883、PCT/GB93/00605、US 08/350260 (5/12/94)、PCT/GB94/01422、PCT/GB94/02662、PCT/GB97/01835 (CAT/MRC)、W090/14443、W090/14424、W090/14430、PCT/US94/1234、W092/18619、W096/07754 (Scripps)、W096/13583、W097/08320 (MorphoSys)、W095/16027 (BioInvent)、W088/06630、W090/3809 (Dyax)、US 4,704,692 (Enzon)、PCT/US91/02989 (Affymax)、W089/06283、EP 371 998、EP 550400 (Xoma)、EP 229 046、PCT/US91/07149 (Ixsys)；或随机产生的肽或蛋白质—US 5723323、5763192、5814476、5817483、5824514、5976862、W086/05803、EP 590 689 (Ixsys, 现在的 Applied Molecular Evolution (AME), 各自都以引用方式全文并入本文中), 或依赖转基因动物免疫接种的那种（例如 SCID 小鼠, Nguyen 等人, Microbiol. Immunol. 41 :901-907 (1997)；Sandhu 等人, Crit. Rev. Biotechnol. 16 :95-118 (1996)；Eren 等人, Immunol. 93 :154-161 (1998), 各自全文以引用方式并入。

具体实施方式

[0085] 申请人例示了从噬菌体展示人 Fab 文库开始选择和制备人抗体的方法, 所述人抗体具有针对人 MCP-1 的所需亲和力、特异性和生物活性。总之, 从所有 10 次淘选筛选出 17856 个克隆, 导致产生 1104 个初步命中物和最后 26 个独特 Fab。

[0086] 为了提供例示了保持有与天然存在的 MCP-1 受体的结合能力的抗原的独特配体, 化学合成人 MCP-1 及其类似物或“突变蛋白质”并进行修饰以特别用于选择、亲和力和生物测定。将人 MCP-1 Ile⁴¹ 和人 MCP-1 Tyr⁴³ 用于初步固相淘选以及抗体选择和亲和力成熟测定的其他方面, 且与 MCP-1 突变蛋白质的生物素化形式：Ile41、Lys(生物素-PEG₄)⁶⁹ 和 Ile41、Lys(生物素-PEG₄)⁷⁵ (SEQ ID NO:1) 一样如本文描述。

[0087] 因为 26 个独特 Fab 在特定的生物测定中都不具有测得为 $K_D < 0.5$ nM 的亲和力或所需 IC₅₀ 值, 所以成熟是必需的。用于亲和力成熟的候选物作为 Fab 进行选择, 且各自的 IgG 与成熟过程平行地进行分析。选择标准是 1) 在整个细胞受体结合测定中的活性, 2) 在钙动员测定中的活性, 3) 对人 MCP-1 的亲和力, 4) 对人 MCP-1 的特异性, 和 5) 对短尾猴 MCP-1 的亲和力和与天然 MCP-1 的结合。

[0088] 溶液中的 MCP-1 的 Fab 捕获模式的 Biacore 亲和力测量对于将成熟候选物分等而言作用良好, 并且亲和力的范围是 49 至 406 nM。最佳的亲本 Fab 显示具有 50 nM 的亲和力, 表明亲和力必须最优化至少 100 倍以达到亲和力成功标准。此外与短尾猴和天然人 MCP-1 的结合可以在 Fab 捕获模式中检测到, 这是关于成熟的另外先决条件。与短尾猴 MCP-1 的亲和力范围与对于人 MCP-1 的亲和力范围相同。由于可能的修饰, 如例如糖基化, 必须显示抗体不仅识别合成或重组 MCP-1, 而且还识别天然 MCP-1, 所述天然 MCP-1 被内源性表达并从人 PANC-1 细胞上清液中纯化。

[0089] 对 MCP-1 的特异性可在 Biacore 的抗体捕获模式中进行测量, 其中加入 100 nM 各

种趋化因子并检测结合信号。用于成熟的大多数候选 Fab 具有特异性,但有几个显示对同源物趋化因子具有一些交叉反应性。

[0090] Fab 的非常重要的特征是中和活性,并且设立了几种不同的测定来分析这种活性。¹²⁵I MCP-1 THP-1 细胞结合测定是最灵敏的测定法,其在最优化后是特别重要的。亲本 Fab 显示具有 10-650nM 的 IC₅₀ 值。除了放射性配体结合测定之外,设计了其他次级生物测定法来证明在 MCP-1 下游信号传导途径的不同水平上的中和活性。

[0091] 吸引单核细胞是 MCP-1 的主要功能之一,但最可能是由于缺少活性、共纯化因子或内毒素,亲本 Fab 在趋化性测定中不起作用,因此同意只测试各自的 IgG1,而不是在这种测定中设法使 Fab 起作用。另一个下游信号传导事件是钙释放到细胞质内。事实上,在放射性配体结合测定中显示具有中和活性的所有 Fab 都在 THP-1 细胞中抑制了 MCP-1 诱导的钙动员,其 IC₅₀ 的范围是 0.1 至 3 μM。必须显示亲本 Fab 的生物活性在转化成 IgG 形式后被完全保留。可以预知,所有各自的 IgG 在放射性配体结合测定、钙动员测定和甚至趋化性测定中都显示具有活性,从而最终证明所有 IgG 都保留了在 Fab 形式中可见的活性并且甚至抑制了 MCP-1 诱导的趋化性。

[0092] 对于亲和力成熟,根据其特征选择了在放射性配体结合测定中 K_d 范围为 10-40nM 而 IC₅₀ 值范围为 10-650nM 的 7 个不同 Fab。随后将它们分成 3 组用于文库克隆和后续选择。L-CDR3 和 H-CDR2 最优化平行地进行。产生高质量的文库。对于选择过程使用溶液淘选,并且选择的严格性可通过减少抗原、解离率选择和非常长的洗涤步骤来增加。对于随后的筛选过程,采用允许对最优化结合剂进行高通量分等的 BioVeris 筛选。筛选可有效地用于鉴定改善的结合剂。此外可以鉴定出 L-CDR3 和 H-CDR2 最优化的 Fab,从而使得可能对 MOR03471 和 MOR03548 衍生物进行交叉克隆。特别是 MOR03471 衍生物的交叉克隆非常成功,导致与 2 个最优化的起始 Fab 比较,亲和力进一步提高了高达 100 倍。在 17 个最优化 Fab 中,选择 16 个用于详细表征,最终符合所有成功标准的 4 个结合剂来源于亲本 MOR03471,2 个仅在 L-CDR3 中最优化,且 2 个来自交叉克隆。亲和力成熟的候选分析物和序列在实例 3 和 4、表 4-6,以及 SEQ ID No :2-28 中有详述。

[0093] 成熟后,最优化结合剂的亲和力不能在 Biacore 中进行分析,这主要是因为达到了检测极限。在 MorphoSys,使用了一种非常灵敏的 K_d 测定方法,其是与 Bioveris 技术组合的溶液平衡滴定法 (SET)。单价解离常数可以通过对于 Fab 和 IgG 的合适拟合模型来计算。除亲和力测量之外,这种方法还可用于交叉反应性研究。对于 BioVeris 中测量的人和短尾猴 MCP-1 而言,最终候选物的亲和力范围是 10 至 320pM,并且在 Centocor 通过 KinexA 证实。使用 BioVeris 的特异性测试显示,所有测试的 16 个 Fab 和 IgG 都不具有与人 MCP-2 的交叉反应性。若干 Fab 和 IgG 还显示与嗜酸细胞活化趋化因子没有明显的交叉反应性。根据成功标准,特异性标准确定为在 Biacore 抗体捕获模式中不与 100nM 同源物人 MCP-2、MCP-3、MCP-4 以及 100nM 人嗜酸细胞活化趋化因子 1、2 和 3 结合。在 Biacore Fab 捕获模式中,所有选择的 Fab 都显示与 MCP-2 和嗜酸细胞活化趋化因子具有不同程度的交叉反应性。与 IgG 比较 Fab 的推定的略微增加的不稳定性和趋化因子的一般非特异性结合能力可能促成了非特异性结合。若干所选 IgG 显示与同源物趋化因子没有显著的结合信号,并且在 Biacore IgG 捕获模式中符合特异性成功标准。在采用 BioVeris 的溶液平衡滴定实验中,甚至若干 Fab 都未显示具有交叉反应性。为了分析在 Biacore 中检测的对 MCP-2 的

Fab 结合活性是否转变成中和活性, Centocor 开发了放射性配体全细胞结合测定。在这种测定中测试的 Fab 显示没有显著抑制 125I 标记的 MCP-2 与 Thp-1 细胞上的 CCR2 受体结合 ($IC_{50} \geq 2 \mu M$)。

[0094] 由于需要少量的 1ng/ml MCP-1, 所以放射性配体结合测定是这个计划中最灵敏的测定, 测定的 IC_{50} 极限对于 Fab 为约 100pM, 而对于 IgG 甚至为 20pM。除了亲和力之外, 该测定中的活性也可用于分等和选择最优化结合剂以便详细表征。在最优化过程中活性的整体改善最高达 1000x 倍, 且最后 1 个 MOR03471 衍生的 Fab MOR03878 显示最高亲和力为 110pM。所有测试的 IgG 在放射性配体结合测定中都保留了活性。4 个 IgG 最终候选物 MOR03781、MOR03790、MOR03850 和 MOR03878 的 IC_{50} 值的范围是 20–50pM, 与 Fab 的各自的活性比较甚至略微更好。关于改善的活性的一个原因是每个二价 IgG 分子中和 2 个 MCP-1 (系数为 2x)。IgG 来自纯的按比例增大的产品, 因此另一个原因可能是抗体的纯度、稳定性或活性。作为次级生物测定, 成功开发了基于 FACS 的测定, 其测量 MCP-1 诱导的 CCR2 受体内化的抑制。最后该测定甚至允许 IC_{50} 测定和分等。4 个最终候选 Fab MOR03790、MOR03850、MOR03781 和 MOR03878 显示 IC_{50} 值的范围是 3 至 5nM。

[0095] 需要天然 MCP-1 以证实针对合成或重组 MCP-1 分离的 MCP-1 抗体的活性。天然 MCP-1 从 PANC1 上清液中进行纯化且用于诱导钙释放。最优化的 Fab 显示以比参考抗体 C775 更高的活性抑制天然 MCP-1 诱导的钙动员。所有 MOR03548 衍生的预先选择的 Fab 在竞争 ELISA 中完全抑制 C775 与 MCP1 的结合。所有 MOR03471 衍生的预先选择的 Fab 在 ELISA 中显示部分 (60%) 竞争, 从而表明表位是至少重叠的。最终 4 个抗体 MOR03781、MOR03790、MOR03850 和 MOR03878 满足所有的成功标准, 包括特异性标准和天然 MCP-1 的中和。

[0096] 生产抗体的其他合适方法

[0097] 如本领域已知和 / 或如本文所述, 用于生产本发明抗体的其他方法能够生产人抗体谱。此类技术包括 (但不限于) 核糖体展示 (Hanes 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94 :4937–4942 (May 1997); Hanes 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95 :14130–14135 (Nov. 1998)); 单细胞抗体生产技术 (例如选择的淋巴细胞抗体法 (“SLAM”) (美国专利 No. 5,627,052, Wen 等人, J. Immunol. 17 :887–892 (1987); Babcook 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 :7843–7848 (1996)); 凝胶微滴和流式细胞术 (Powell 等人, Biotechnol. 8 :333–337 (1990); One Cell Systems, Cambridge, MA; Gray 等人, J. Imm. Meth. 182 :155–163 (1995); Kenny 等人, Bio/Technol. 13 :787–790 (1995)); B- 细胞选择 (Steenbakkers 等人, Molec. Biol. Reports 19 :125–134 (1994); Jonak 等人, Progress Biotech, Vol. 5, In Vitro Immunization in Hybridoma Technology, Borrebaeck (编辑), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands (1988))。

[0098] 用于工程化的或人源化非人或人抗体的方法也可以使用并且是本领域所熟知的。一般来讲, 人源化或工程化的抗体具有来自非人来源的一个或多个氨基酸残基, 所述非人来源例如 (但不限于) 小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物或其他哺乳动物。这些人氨基酸残基通常称为“输入”残基, 它们一般取自已知人序列的“输入”可变结构域、恒定结构域或其他结构域。已知的人 Ig 序列是本领域熟知的且可以是任何已知序列。用于使工程化的人源化抗体的结合、构象最优化和减少其免疫原性的各种策略已得到描述, 参见, 例如 Presta

等人, J Immunol. 151 :2623-2632, 1993 ;W0200302019 和 W02005080432。

[0099] 如本领域已知的, 此类输入序列可用于减少免疫原性, 或减少、增强或修饰结合性、亲和力、结合率、解离率、亲和力、特异性、半衰期或任何其他合适的特征。一般来讲, 部分或全部非人或人 CDR 序列被维持, 而可变区和恒定区的非人序列被用人或其他氨基酸置换。抗体还可以任选是人源化的, 保留对抗原的高亲和力和其他有利的生物学特性。为了达到这个目标, 人源化抗体还可以任选使用亲本和人源化序列的三维模型通过亲本序列和各种概念上的人源化产物的分析过程进行制备。三维免疫球蛋白模型通常是可用的并且是为本领域的技术人员所熟悉的。举例说明且显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序是可用的。这些展示的检测使得能分析在候选免疫球蛋白序列的功能发挥中残基的可能作用, 即分析影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基。以这种方式, 可以从共有和输入序列中选择和组合 FR 残基, 从而能实现所需抗体特征, 例如对靶抗原的增加的亲和力。通常, CDR 残基直接且基本上大多数涉及影响抗原结合。本发明抗体的人源化或工程化的可以用任何已知的方法进行, 例如但不限于下列文献中描述的那些: Winter(Jones 等人, Nature 321 :522(1986) ;Riechmann 等人, Nature 332 :323(1988) ; Verhoeyen 等人, Science239 :1534(1988)), Sims 等人, J. Immunol. 151 :2296(1993) ; Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol. 196 :901(1987), Carter 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89 :4285(1992) ;Presta 等人, J. Immunol. 151 :2623(1993), 美国专利 No :5723323、5976862、5824514、5817483、5814476、5763192、5723323、5, 766886、5714352、6204023、6180370、5693762、5530101、5585089、5225539 ;4816567、PCT/ :US98/16280、US96/18978、US91/09630、US91/05939、US94/01234、GB89/01334、GB91/01134、GB92/01755 ;W090/14443、W090/14424、W090/14430、EP229246, 各自以引用方式全文并入本文中, 包括其中引用的参考文献。

[0100] 可以生产与人抗原结合的人抗体谱的转基因小鼠可以通过已知方法产生(例如, 但不限于, 授予 Lonberg 等人的美国专利 No :5, 770, 428、5, 569, 825、5, 545, 806、5, 625, 126、5, 625, 825、5, 633, 425、5, 661, 016 和 5, 789, 650 ;Jakobovits 等人的 W0 98/50433, Jakobovits 等人的 W098/24893, Lonberg 等人的 W0 98/24884, Lonberg 等人的 W0 97/13852, Lonberg 等人的 W0 94/25585, Kucherlapate 等人的 W0 96/34096, Kucherlapate 等人的 EP 0463 151 B1, Kucherlapate 等人的 EP 0710 719A1, Surani 等人的美国专利 No. 5, 545, 807, Bruggemann 等人的 W090/04036, Bruggemann 等人的 EP 0438 474 B1, Lonberg 等人的 EP 0814259 A2, Lonberg 等人的 GB 2 272 440 A, Lonberg 等人, Nature368 :856-859(1994), Taylor 等人, Int. Immunol. 6(4)579-591(1994), Green 等人, Nature Genetics 7 :13-21(1994), Mendez 等人, Nature Genetics 15 :146-156(1997), Taylor 等人, Nucleic AcidsResearch 20(23) :6287-6295(1992), Tuailon 等人, Proc Natl AcadSci USA 90(8)3720-3724(1993), Lonberg 等人, Int Rev Immunol13(1) :65-93(1995) 和 Fishwald 等人, Nat Biotechnol 14(7) :845-851(1996), 所述参考文献各自以引用方式全文并入本文中)。一般来讲, 这些小鼠包含至少一种包括来自至少一种人免疫球蛋白基因座的 DNA 的转基因, 所述基因座是功能性重排的, 或可以经历功能性重排。此类小鼠中的内源免疫球蛋白基因座可以被破坏或缺失以消除动物产生由内源基因编码的抗体的能力。

[0101] 与相似蛋白质或片段特异性结合的抗体筛选可以方便地使用肽展示文库来完成。这种方法涉及在大型肽集合中筛选具有所需功能或结构的个别成员。肽展示文库的抗体筛选是本领域熟知的。所展示的肽序列的长度可以是 3 至 5000 个或更多个氨基酸,通常为 5 至 100 个氨基酸长,并且通常为约 8 至 25 个氨基酸长。除用于产生肽文库的直接化学合成方法之外,几种重组 DNA 方法已得到描述。一种类型涉及在噬菌体或细胞表面上展示肽序列。每个噬菌体或细胞包含编码特定展示的肽序列的核苷酸序列。此类方法在 PCT 专利公布 No. 91/17271、No. 91/18980、No. 91/19818 和 No. 93/08278 中有所描述。用于产生肽文库的其他系统具有体外化学合成和重组方法这两个方面。参见 PCT 专利公布 No. 92/05258、No. 92/14843 和 No. 96/19256。还可参见,美国专利 No. 5,658,754 和 No. 5,643,768。肽展示文库、载体和筛选试剂盒可从供应商如 Invitrogen (Carlsbad, CA) 和 Cambridge antibody Technologies (Cambridgeshire, UK) 商购获得。参见,例如转让给 Enzon 的美国专利 No. 4704692、No. 4939666、No. 4946778、No. 5260203、No. 5455030、No. 5518889、No. 5534621、No. 5656730、No. 5763733、No. 5767260、No. 5856456;转让给 Dyax 的 No. 5223409、No. 5403484、No. 5571698、No. 5837500;转让给 Affymax 的 No. 5427908、No. 5580717;转让给 Cambridge antibody Technologies 的 No. 5885793;转让给 Genentech 的 No. 5750373;转让给 Xoma 的 No. 5618920、No. 5595898、No. 5576195、No. 5698435、No. 5693493、No. 5698417;Colligan, 同上;Ausubel, 同上;或 Sambrook, 同上;上述专利和出版物各自以引用方式全文并入本文中。

[0102] 2. 本发明的核酸

[0103] 使用本文提供的信息,例如编码 SEQ ID NO:2-5 和 27-28 中至少一个的至少 70-100% 邻接氨基酸的核苷酸序列、其特定片段、变体或共有序列,编码至少一种抗 MCP-1 抗体的本发明核酸分子可以使用本文描述的或本领域已知的方法获得。本发明的分离的核酸分子可包括包含可读框 (ORF) 的核酸分子,任选具有一个或多个内含子,例如(但不限于)至少一条重链(例如 SEQ ID NO:6-12、22 和 23)或轻链(例如 SEQ ID NO:13-21 和 24-26)的至少一个 CDR 如 CDR-1、CDR-2 和 / 或 CDR-3 的至少一个特定部分;包含抗 MCP-1 抗体或可变区(例如 SEQ ID NO:2-5、27 和 28)编码序列的核酸分子;和包含基本上不同于上述那些的核苷酸序列,但由于遗传密码简并性而如本文所述和 / 或如本领域已知仍可编码至少一种抗 MCP-1 抗体的核酸分子。当然,遗传密码是本领域熟知的。因此,对于本领域技术人员而言,应该可以按常规生产编码本发明的特异性抗 MCP-1 抗体的此类简并核酸变体。参见,例如 Ausubel 等人,同上,并且此类核酸变体包括在本发明中。

[0104] 如本文所指出的,包含编码抗 MCP-1 抗体的核酸的本发明核酸分子可包括(但不限于)单独编码抗体片段的氨基酸序列的那些;关于完整抗体或其部分的编码序列;关于抗体、片段或部分以及附加序列的编码序列,例如至少一种信号前导序列或融合肽的编码序列,具有或不具有前述的附加编码序列,例如至少一个内含子,连同附加的非编码序列一起,包括但不限于,非编码的 5' 和 3' 序列,例如在转录、mRNA 加工,包括剪接和多腺苷酸化信号(例如 mRNA 的核糖体结合和稳定性)中起作用的转录的非翻译序列;编码附加氨基酸例如提供附加功能性的那些的附加编码序列。因此,编码抗体的序列可以与标记序列例如编码肽的序列融合,所述肽可促进包含抗体片段或部分的融合抗体纯化。

[0105] 与如本文所述的多核苷酸选择性杂交的多核苷酸:本发明提供了在选择性杂交条

件下与本文所公开的多核苷酸杂交的分离的核酸。因此,该实施例的多核苷酸可用于分离、检测和 / 或定量包含此类多核苷酸的核酸。例如,本发明的多核苷酸可用于在保藏的文库中鉴定、分离或扩增部分或全长克隆。在一些实施例中,多核苷酸是分离的基因组或 cDNA 序列,或者与来自人或哺乳动物核酸文库的 cDNA 互补。

[0106] 优选地, cDNA 文库包含至少 80% 的全长序列, 优选至少 85% 或 90% 的全长序列, 且更优选至少 95% 的全长序列。cDNA 文库可以进行标准化以增加罕见序列的表现。低或中等严格杂交条件一般但不是唯一地用于相对于互补序列具有减少的序列同一性的序列。中等和高严格条件可以任选用于同一性更大的序列。低严格条件允许具有约 70% 序列同一性的序列进行选择杂交, 并且可以用于鉴定直系同源或旁系同源序列。

[0107] 任选地, 本发明的多核苷酸将编码由本文所述多核苷酸编码的抗体的至少一部分。本发明的多核苷酸包含可以用于与编码本发明抗体的多核苷酸选择性杂交的核酸序列。参见, 例如 Ausubel, 同上; Colligan, 同上, 各自以引用方式全文并入本文中。

[0108] 核酸的构建: 本发明的分离的核酸可以使用本领域熟知的 (a) 重组方法、(b) 合成技术、(c) 纯化技术或其组合进行制备。

[0109] 用于构建核酸的重组方法: 本发明的分离的核酸组合物 (例如 RNA、cDNA、基因组 DNA 或其任何组合) 可以使用本领域技术人员已知的任何数目的克隆方法从生物学来源获得。在一些实施例中, 将在严格条件下与本发明多核苷酸选择性杂交的寡核苷酸探针用于在 cDNA 或基因组 DNA 文库中鉴定所需序列。RNA 的分离, 以及 cDNA 和基因组文库的构建是本领域技术人员熟知的 (参见, 例如 Ausubel, 同上; 或 Sambrook, 同上)。

[0110] 核酸筛选和分离方法: cDNA 或基因组文库可以使用依据本发明多核苷酸序列 (例如本文所公开的那些) 的探针进行筛选。探针可以用于与基因组 DNA 或 cDNA 序列杂交以分离相同或不同生物中的同源基因。本领域的技术人员将会知道, 可以在测定中采用各种程度的杂交严格性; 并且杂交或洗涤介质可以是严格的。随着用于杂交的条件变得更严格, 在发生双链体形成的探针和靶之间必须存在更大程度的互补性。严格性的程度可以由温度、离子强度、pH 和部分变性溶剂如甲酰胺的存在中的一者或多者加以控制。例如, 杂交的严格性可通过经由例如将甲酰胺浓度操纵在 0% 至 50% 内而改变反应物溶液的极性来方便地加以改变。可检测的结合所需的互补性 (序列同一性) 程度将根据杂交介质和 / 或洗涤介质的严格性而变化。互补性程度将最佳为 100% 或 70-100% 或其中的任何范围或值。然而, 应当理解探针和引物中较小的序列变异可以通过减少杂交和 / 或洗涤介质的严格性进行补偿。

[0111] 扩增 RNA 或 DNA 的方法是本领域熟知的, 并且基于本文呈现的教导和指导, 无需过度实验即可根据本发明使用。DNA 或 RNA 扩增的已知方法包括 (但不限于) 聚合酶链反应 (PCR) 和相关扩增方法 (Mullis 等人, 美国专利 No. 4, 683, 202 (1987); 和 Innis 等人, PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990))。

[0112] 用于构建核酸的合成方法: 本发明的分离的核酸还可以通过已知方法通过直接化学合成进行制备 (参见, 例如 Ausubel 等人, 同上)。化学合成一般产生单链寡核苷酸, 其可以通过与互补序列杂交, 或使用单链作为模板用 DNA 聚合酶进行聚合来转变成双链 DNA。本领域技术人员将认识到, 虽然 DNA 的化学合成可能限制于约 100 个或更多个碱基的序列,

但较长的序列可以通过连接较短序列来获得。关于编码序列的化学合成的特别优选的方法在美国专利 No. 6521427 和 No. 6670127 中有教导。

[0113] 3. 载体和表达系统

[0114] 本发明提供了包含编码抗 MCP-1 抗体的核酸的载体, 优选表达载体, 或可用于获得包含各种抗体 HC 或 LC 基因或其部分的质粒。如本文所用, 术语“载体”指能够转运与其连接的另一种核酸的核酸分子。一种载体类型是“质粒”, 这指另外的 DNA 片段可以连接到其内的环状双链 DNA 环。另一种载体类型是病毒载体, 其中另外的 DNA 片段可以连接到病毒基因组内。本发明还涉及包括本发明的分离的核酸分子的载体、用重组载体基因工程改造的宿主细胞, 以及通过本领域熟知的重组技术生产至少一种抗 MCP-1 抗体。参见, 例如, Sambrook 等人, 同上; Ausubel 等人, 同上, 各自以引用方式全文并入本文中。

[0115] 对于抗体或其抗体片段的表达, 可以将编码部分或全长轻链和重链的 DNA 插入表达盒或载体内, 使得基因与转录和翻译控制序列可操作地连接。编码抗体的盒可以作为构建体进行装配。构建体可以使用本领域已知的方法进行制备。构建体可以作为较大质粒的部分进行制备。这样的制备允许以有效方式克隆和选择正确构造。构建体可以位于质粒或其他载体上的方便的限制位点之间, 从而使得它们可以容易地与其余的质粒序列分开。

[0116] 一般来讲, 质粒载体在沉淀物例如磷酸钙沉淀物中, 或在含 DEAE 葡聚糖的带电脂质的复合物中被引入。如果载体是病毒, 那么它可以使用合适的包装细胞系在体外进行包装且随后转导进宿主细胞内。载体构建体引入宿主细胞内还可以通过电穿孔或其他已知方法来实现。此类方法已在本领域中有所描述, 例如 Sambrook, 同上, 第 1-4 和 16-18 章; Ausubel, 同上, 第 1、9、13、15、16 章。

[0117] 在这种背景中, 术语“可操作地连接的”意指抗体基因被连接到载体内, 使得载体内的转录和翻译控制序列发挥其调节抗体基因转录和翻译的预期功能。选择与使用的表达宿主细胞相容的表达载体和表达控制序列。抗体轻链基因和抗体重链基因可以被插入分开的载体内, 或典型地, 这两种基因都被插入相同的表达载体内。抗体基因可通过标准方法 (例如抗体基因片段和载体上的互补限制位点的连接, 或如果不存在限制位点, 则为平端连接) 插入表达载体内。

[0118] 通过将本文所述抗体的轻链和重链可变区插入已编码所需同种型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体内, 使得 VH 片段与载体内的 CH 片段可操作地连接, 并且 VI 片段与载体内的 CL 片段可操作地连接, 可以将它们用于制备任何抗体同种型的全长抗体基因。另外或作为另外一种选择, 重组表达载体可以编码促进抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。可以将抗体链基因克隆到载体内, 使得信号肽与抗体链基因的氨基端框内连接。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽 (即来自非免疫球蛋白的信号肽)。

[0119] 尽管理论上可以在原核或真核宿主细胞中表达本发明的抗体, 但抗体在真核细胞且最优选哺乳动物宿主细胞中的表达是最优选的, 因为此类真核细胞特别是哺乳动物细胞比原核细胞更可能装配和分泌正确折叠和免疫活性的抗体。

[0120] 通常, 哺乳动物表达载体将包含 (1) 调节元件, 通常是病毒启动子或增强子序列的形式, 并且特征在于宽的宿主和组织范围; (2) 促进包含抗体编码序列的 DNA 片段插入质粒载体内的“多接头”序列; 和 (3) 负责 mRNA 转录物的内含子剪接和多腺苷酸化的序列。这种启动子-多接头-多腺苷酸化位点的邻接区域通常称为转录单位。载体将还可能包含

(4) 选择标记基因(例如, β -内酰胺酶基因),其通常赋予对抗生素(例如氨苄青霉素)的抗性,从而使得能在大肠杆菌(*E. coli*)中选择最初的阳性转化体;和(5)促进载体在细菌和哺乳动物宿主中复制的序列。将质粒复制起点包括在内以便在大肠杆菌中繁殖表达构建体,并且为了在 Cos 细胞中瞬时表达,将 SV40 复制起点包括在表达质粒中。

[0121] 启动子可以选自 SV40 启动子(例如晚期或早期 SV40 启动子)、CMV 启动子(美国专利 No. 5, 168, 062 ;No. 5, 385, 839)、HSV tk 启动子、pgk(磷酸甘油酸激酶)启动子、EF-1 α 启动子(美国专利 No. 5, 266, 491)、至少一种人免疫球蛋白启动子。

[0122] 表达载体将优选但任选包括至少一种选择标记。此类标记包括例如(但不限于)用于真核细胞培养的氨甲蝶呤(MTX)、二氢叶酸还原酶(DHFR, 美国专利 No. 4, 399, 216 ;No. 4, 634, 665 ;No. 4, 656, 134 ;No. 4, 956, 288 ;No. 5, 149, 636 ;No. 5, 179, 017, 氨苄青霉素、新霉素(G418)、霉酚酸或谷氨酰胺合成酶(GS, 美国专利 No. 5, 122, 464 ;No. 5, 770, 359 ;No. 5, 827, 739)抗性,和用于在大肠杆菌和其他细菌或原核生物中培养的四环素或氨苄青霉素抗性基因(由此将上述专利全文以引用方式并入)。用于上述宿主细胞的合适培养基和条件是本领域已知的。合适的载体对于技术人员来说将是显而易见的。

[0123] 当使用真核宿主细胞时,通常会将多腺苷酸化或转录终止序列整合进载体内。终止序列的例子是来自牛生长激素基因的多腺苷酸化序列。还可包括用于正确剪接转录物的序列。剪接序列的例子是来自 SV40 的 VP1 内含子(Sprague 等人, *J. Virol.* 45 : 773-781(1983))。此外,如本领域已知的,可以将控制宿主细胞中的复制的基因序列整合进载体内。同样,为了避免重链分子的高表面表达,可能必需使用消除跨膜结构域变体剪接的表达载体。

[0124] 附加元件包括增强子、Kozak 序列以及侧接用于 RNA 剪接的供体和受体位点的间隔序列。高效率的转录可以使用下列序列来实现:来自 SV40 的早期启动子和晚期启动子,来自逆转录病毒例如 RSV、HTLVI、HIVI 的长末端重复序列(LTRS),和巨细胞病毒(CMV)的早期启动子。然而,也可以使用细胞元件(例如人肌动蛋白启动子)。用于实践本发明的合适表达载体包括(例如)载体如 pIRES1neo、pRetro-Off、pRetro-On、PLXSN 或 pLNCX(Clontech Labs, Palo Alto, CA)、pcDNA3.1(+/-)、pcDNA/Zeo(+/-)或 pcDNA3.1/Hygro(+/-)(Invitrogen)、PSVL 和 PMSG(Pharmacia, Uppsala, Sweden)、pRSVcat(ATCC 37152)、pSV2dhfr(ATCC 37146)和 pBC12MI(ATCC 67109)。

[0125] 作为另外一种选择,编码抗体序列的核酸可以在包含整合到染色体内的基因的 稳定细胞系中表达。与选择标记例如 dhfr、gpt、新霉素或潮霉素共转染使得能鉴定和分离表达大量所编码抗体的转染细胞。DHFR(二氢叶酸还原酶)标记可用于开发携带几百或甚至几千拷贝的所关注基因的细胞系。另一种可用的选择标记是谷氨酰胺合成酶(GS)(Murphy 等人, *Biochem. J.* 227 :277-279(1991);Bebbington 等人, *Bio/Technology* 10 : 169-175(1992))。使用这些标记,哺乳动物细胞在选择培养基中生长且选择具有最高抗性的细胞。这些细胞系包含整合到染色体内的扩增的基因。中国仓鼠卵巢(CHO)和 NS0 细胞通常用于生产抗体。

[0126] 本发明抗体生产中使用的 DNA 构建体可以任选包括至少一种隔离子(insulator)序列。术语“隔离子”、“隔离子序列”和“隔离子元件”在本文中可互换使用。隔离子元件是隔离置于其作用范围内的基因转录但不会负面或正面干扰基因表达的控制元件。优选地,

隔离子序列插入待转录的 DNA 序列的任何一侧上。例如,隔离子可以定位于距离启动子 5' 约 200bp 至约 1kb,且在所关注基因 3' 末端处距离启动子至少约 1kb 至 5kb。隔离子序列与启动子和所关注基因的 3' 末端的距离可以由本领域技术人员根据所关注基因的相对大小、构建体中使用的启动子和增强子来进行确定。此外,超过一个隔离子序列可以定位于启动子的 5' 或转基因的 3' 末端处。例如,2 个或更多个隔离子序列可以定位于启动子的 5'。转基因 3' 末端处的一个或多个隔离子可以定位于所关注基因的 3' 末端处,或 3' 调节序列如 3' 非翻译区 (UTR) 或 3' 侧翼序列的 3' 末端处。

[0127] 合适的诱导型非融合大肠杆菌表达载体的例子包括 pTrc (Amann 等人, (1988) Gene 69 :301-315) 和 pET 11d (Studier 等人, Gene Expression Technology :Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89)。来自 pTrc 载体的靶基因表达依赖于从杂交 trp-lac 融合启动子起的宿主 RNA 聚合酶转录。来自 pET 11d 载体的靶基因表达依赖于共表达的病毒 RNA 聚合酶 (T7 gn1) 介导的、从 T7 gn10-lac 融合启动子起的转录。这种病毒聚合酶由来自定居 λ 原噬菌体的宿主株 BL21 (DE3) 或 HMS 174 (DE3) 供应,所述 λ 原噬菌体具有在 lacUV 5 启动子的转录控制下的 T7 gn1 基因。

[0128] 在另一个实施例中,表达载体是酵母表达载体。用于在啤酒糖酵母 (*S. cerevisiae*) 中表达的载体例子包括 pYepSec1 (Baldari 等人, (1987) EMBO J. 6 : 229-234)、pMFa (Kurjan 和 Herskowitz, (1982) Cell 30 :933-943)、pJRY88 (Schultz 等人, (1987) Gene 54 :113-123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.), 以及 pPicZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.)。

[0129] 或者,表达载体是杆状病毒表达载体。可用于在培养的昆虫细胞 (例如 Sf 9 细胞) 中表达蛋白质的杆状病毒载体包括 pAc 系列 (Smith 等人, (1983) Mol. Cell Biol. 3 : 2156-2165) 和 pVL 系列 (Lucklow 和 Summers (1989) Virology 170 :31-39)。

[0130] 在又一个实施例中,本发明的核酸使用哺乳动物表达载体在哺乳动物细胞中进行表达。哺乳动物表达载体的例子包括 pCDM8 (Seed (1987) Nature 329 :840) 和 pMT2PC (Kaufman 等人 (1987) EMBO J. 6 :187-195)。当在哺乳动物细胞中使用时,表达载体的控制功能通常由病毒调节元件提供。例如,常用的启动子来源于多瘤病毒、腺病毒 2、巨细胞病毒和猴病毒 40。关于原核和真核细胞的其他合适表达系统,参见 Sambrook 等人,同上的第 16 和 17 章。

[0131] 在另一个实施例中,重组哺乳动物表达载体能够引导核酸表达,优选在特定细胞类型,例如淋巴瘤细胞 (例如小鼠骨髓瘤细胞) 中。在特定细胞类型中,组织特异性调节元件用于表达核酸。组织特异性调节元件是本领域已知的。合适的组织特异性启动子的非限制性实例包括清蛋白启动子 (肝特异性; Pinkert 等人 (1987) Genes Dev. 1 :268-277), 淋巴样特异性启动子 (Calame 和 Eaton (1988) Adv. Immunol. 43 :235-275), 特别是 T 细胞受体 (Winoto 和 Baltimore (1989) EMBO J. 8 :729-733) 和免疫球蛋白 (Banerji 等人 (1983) Cell 33 :729-740; Queen 和 Baltimore (1983) Cell 33 :741-748) 启动子,神经元特异性启动子 (例如神经丝启动子; Byrne 和 Ruddle (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 :5473-5477), 胰腺特异性启动子 (Edlund 等人 (1985) Science 230 :912-916), 和乳腺特异性启动子 (例如乳清启动子; 美国专利 No. 4, 873, 316 和欧洲专利申请公开 No. 264, 166)。还可包含发育调节启动子,例如鼠 hox 启动子 (Kessel 和 Gruss (1990) Science 249 :374-379) 和 α -胎蛋

白启动子 (Campes 和 Tilghman(1989)Genes Dev. 3 :537-546)。

[0132] 本发明还提供了包含在反义方向上克隆到表达载体内的 DNA 分子的重组表达载体。即, DNA 分子以允许 RNA 分子表达(通过 DNA 分子转录)的方式与调节序列可操作地连接,所述 RNA 分子对编码多肽的 mRNA 而言是反义的。可以选择与在反义方向上克隆的核酸可操作地连接的调节序列,它指导反义 RNA 分子在多种细胞类型中的连续表达。例如,可以选择这样的病毒启动子和 / 或增强子或调节序列,其可指导反义 RNA 的组成型表达、组织特异性表达或细胞类型特异性表达。反义表达载体可以是重组质粒、噬菌粒或减弱病毒的形式,其中反义核酸在高效率调节区的控制下产生,其活性可以由载体引入其中的细胞类型来决定。关于使用反义基因的基因表达调节的讨论,参见 weintraub 等人 (Reviews--Trends in Genetics, Vol. 1(1)1986)。

[0133] 在骨髓瘤细胞中的克隆和表达

[0134] 称为 cM-T412(全文以引用方式并入的 EP0511308)的针对人 CD4 的嵌合小鼠 / 人 IgG1k 单克隆抗体,被观察到在转染的小鼠骨髓瘤细胞中以高水平表达 (Looney 等人, 1992.Hum Antibodies Hybridomas 3(4):191-200)。在最优化培养条件方面没有大量努力,在 1990 年 Centocor, Inc (Malvern, PA) 容易地获得 > 500mg/L 的生产水平(在 pg/ 细胞 / 天的基础上的比生产力未知)。基于这些表达载体的组分,开发了可用于 HC 和 LC 克隆的抗体克隆载体,它包括基因启动子 / 转录起始核酸序列、5' 非翻译序列和翻译起始核酸序列、编码信号序列的核酸序列、用于信号内含子和 J-C 内含子的内含子 / 外显子剪接供体序列,以及 J-C 内含子增强子核酸序列。质粒 p139, pUC19 质粒包含从分泌完全小鼠 M-T412 Ab 的 C123 杂交瘤细胞克隆的 5.8kb EcoRI-EcoRI 基因组片段;该片段包含 cM-T412 HC 基因的启动子和 V 区部分。用于 LC V 区载体工程改造的原材料是质粒 p39, 包含从 C123 杂交瘤细胞克隆的 3kb HindIII-HindIII 基因组片段的 pUC 质粒;该片段包含 cM-T412 LC 基因的启动子和 V 区部分。来源于 p139 和 p39 的工程改造的载体被设计成能够在 2 步过程中方便地装配适用于在哺乳动物宿主细胞中表达的 HC 或 LC 基因,所述过程需要 1) 克隆编码在 V 区载体中特别制备的限制位点之间的所关注序列的 DNA, 由此 V 区编码序列紧位于载体编码的信号序列下游,以及部分或全部基因启动子下游;和 2) 转移在正确方向上跨越从 V 区载体到 C 区载体的插入序列的片段,由此所得质粒构成适用于在细胞中表达的最终表达质粒 (Scallion 等人, 1995 Cytokine 7(8):759-769)。

[0135] 在 CHO 细胞中的克隆和表达

[0136] 质粒 pC4 是质粒 pSV2-dhfr(ATCC 登记号 37146)的衍生物。该质粒包含在 SV40 早期启动子控制下的小鼠 DHFR 基因。用这些质粒转染的中国仓鼠卵巢或缺乏二氢叶酸活性的其他细胞,可以通过使细胞在补加了化学治疗剂氨甲蝶呤的选择培养基(例如 alpha minus MEM, Life Technologies, Gaithersburg, MD) 中生长进行选择。对氨甲蝶呤 (MTX) 具有抗性的细胞中的 DHFR 基因的扩增已得到充分证明(参见,例如, F. W. Alt 等人, J. Biol. Chem. 253:1357-1370(1978); J. L. Hamlin 和 C. Ma, Biochem. et Biophys. Acta 1097:107-143(1990); 以及 M. J. Page 和 M. A. Sydenham, Biotechnology 9:64-68(1991))。在浓度渐增的 MTX 中生长的细胞由于 DHFR 基因扩增,通过超量生产靶酶 DHFR 而发展出对药物的抗性。如果第二种基因与 DHFR 基因连接,那么它通常被共扩增和过表达。本领域已知的是这种方法可用于开发携带超过 1,000 个拷贝的扩增基因的细胞系。随后,当氨甲蝶呤被

取出时,获得包含整合到宿主细胞的一个或多个染色体内的扩增的基因的细胞系。

[0137] 质粒 pC4 包含用于表达所关注基因的劳斯肉瘤病毒的长末端重复序列 (LTR) 的强启动子 (Cullen 等人, *Molec. Cell. Biol.* 5:438-447(1985)), 和从人巨细胞病毒 (CMV) 的即刻早期基因的增强子分离的片段 (Boshart 等人, *Cell* 41:521-530(1985))。启动子的下游是允许基因整合的 BamHI、XbaI 和 Asp718 限制酶切割位点。在这些克隆位点之后,该质粒包含 3' 内含子和大鼠前胰岛素原基因的多腺苷酸化位点。其他高效率的启动子也可以用于表达,例如人 β -肌动蛋白启动子、SV40 早期或晚期启动子或来自其他逆转录病毒例如 HIV 和 HTLV-I 的长末端重复序列。Clontech 的 Tet-Off 和 Tet-On 基因表达系统和类似系统可以用于在哺乳动物细胞中以受调节的方式表达 MCP-1 抗体 (M. Gossen 和 H. Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551(1992))。对于 mRNA 的多腺苷酸化,也可以使用 (例如) 来自人生长激素或珠蛋白基因的其他信号。

[0138] 4. 用于生产抗体的宿主细胞

[0139] 如本领域所熟知的,本发明的至少一种抗 MCP-1 抗体可以任选通过细胞系、混合细胞系、无限增殖化细胞或无限增殖化细胞的克隆群体来生产。参见,例如, Ausubel 等人 (编辑), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY(1987-2004); Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第 2 版, Cold Spring Harbor, NY(1989); Harlow 和 Lane, *antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY(1989); Colligan 等人 (编辑), *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY(1994-2004); Colligan 等人, *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2004), 各自以引用方式全文并入本文中。

[0140] 为了生产生物药物产品,需要能够有效和可重复表达重组多肽的生产细胞系。该细胞系是稳定且可获利的 (bankable)。多种宿主细胞系可用于该目的。作为对细胞机器如何影响生物治疗产品的最终量和组成的复杂性的理解,将赋予产品生产和组成所需属性的宿主细胞系的选择变得更明显。

[0141] 与由连续基因组 DNA 序列转录的大多数基因不同,抗体基因由可以在种系中广泛分开的基因片段装配。具体地讲,重链基因由编码抗体可变 (V) 区、多变 (D) 区和连接 (J) 区 / 恒定 (C) 区的 3 个基因组片段重组形成。功能性轻链基因通过连接 2 个基因片段形成; 一个编码 V 区且另一个编码 J/C 区。重链和 K 轻链基因座都包含估计跨越大大超过 1000kb 的多个 V 基因片段 (估计大小在 100s 和 1000s 之间变化)。相反, λ 基因座小得多,并且已显示在小鼠染色体 16 上跨越大约 300kb。它由 2 个可变基因片段和 4 个连接 / 恒定 (J/C) 区基因片段组成。功能性基因的形成需要 V 和 J/C 元件之间的重组。

[0142] 在其中抗体天然产生的 B 细胞中,重排的重链和 K 轻链基因的转录控制依赖 V 区上游的组织特异性启动子和位于 J-C 内含子中的组织特异性增强子的活性。这些元件协同发挥作用。同样,第二种 B 细胞特异性增强子已在 K 轻链基因座中鉴定。这个另外的增强子位于 C_k 下游 9kb 处。因此,使抗体表达基因无限增殖化的杂交瘤方法依赖亲本 B 细胞谱系的内源启动子和增强子序列。或者,本发明的核酸可以在包含编码本发明抗体的内源 DNA 的宿主细胞中通过开启 (通过操纵) 在宿主细胞中进行表达。此类方法是本领域熟知的,例如,如美国专利 No. 5, 580, 734、No. 5, 641, 670、No. 5, 733, 746 和 No. 5, 733, 761 中所述,所述专利以引用方式全文并入本文中。

[0143] 将抗体基因组 DNA 克隆到人造载体内是制备能够表达抗体的宿主细胞的另一种方法。然而,在强启动子之后的单克隆抗体的表达增加了鉴定高生产细胞系和获得更高产量的单克隆抗体的机会。本发明的抗体可以采用(例如)本领域熟知的重组 DNA 技术和基因转染方法的组合(例如 Morrison, S. (1985) Science 229:1202)在宿主细胞转染瘤中生产。

[0144] 用于在多种不同宿主细胞中克隆和表达生物药物(包括抗体)的系统是熟知的。合适的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、植物细胞、酵母和杆状病毒系统以及转基因植物和动物。在本领域中可用于表达异源多肽完整糖基化蛋白的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾细胞(BHK)、NSO 小鼠黑素瘤细胞和衍生细胞系,例如 SP2/0、YB2/0(ATC CRL-1662)大鼠骨髓瘤细胞、人胚肾细胞(HEK)、人胚视网膜细胞 PerC.6 细胞、hep G2 细胞、BSC-1(例如, ATCC CRL-26),以及可从(例如)美国典型培养物保藏中心(Manassas, Va(www.atcc.org))获得的许多其他细胞。常见的优选细菌宿主是大肠杆菌。

[0145] 哺乳动物细胞例如 CHO 细胞、骨髓瘤细胞、HEK293 细胞、BHK 细胞(BHK21, ATCC CRL-10)、小鼠 Ltk- 细胞和 NIH3T3 细胞已经常用于异源基因的稳定表达。相比之下,细胞系如 Cos(COS-1 ATCC CRL 1650 ;COS-7, ATCC CRL-1651) 和 HEK293 被常规地用于重组蛋白质的瞬时表达。

[0146] 由于其高表达率,用于表达本发明重组抗体的优选哺乳动物宿主细胞包括骨髓瘤细胞,例如 Sp2/0、YB2/0(ATC CRL-1662)、NSO 和 P3X63. Ag8. 653(例如 SP2/0-Ag14)。特别地,对于与 NSO 骨髓瘤细胞的使用,另一种优选的表达系统是 WO 87/04462、WO 89/01036 和 EP 338,841 中公开的 GS 基因表达系统。当编码抗体基因的重组表达载体引入哺乳动物宿主细胞中时,抗体通过使宿主细胞培养足够的时间段来产生,所述时间段允许抗体在宿主细胞中表达,或更优选地,允许抗体分泌到宿主细胞在其中生长的培养基内。可以使用标准蛋白质纯化方法从培养基回收抗体。

[0147] 可用于生产抗体、其特定部分或变体的细胞培养物的实例是哺乳动物细胞。哺乳动物细胞系统通常将是细胞单层的形式,但是也可以使用哺乳动物细胞悬浮液或生物反应器。

[0148] 在本领域中已经开发了许多能够表达完整糖基化蛋白的合适宿主细胞系,并且包括 COS-1(例如 ATCC CRL 1650)、COS-7(例如 ATCC CRL-1651)、HEK293、BHK21(例如 ATCC CRL-10)、CHO(例如 ATCC CRL1610) 和 BSC-1(例如 ATCC CRL-26) 细胞系, Cos-7 细胞、CHO 细胞、hepG2 细胞、P3X63Ag8. 653、SP2/0-Ag14、293 细胞、HeLa 细胞等,它们可容易地从(例如)美国典型培养物保藏中心(Manassas, Va(www.atcc.org))获得。优选的宿主细胞包括淋巴样来源的细胞,例如骨髓瘤和淋巴瘤细胞。特别优选的宿主细胞是 P3X63Ag8. 653 细胞(ATCC 登记号 CRL-1580) 和 SP2/0-Ag14 细胞(ATCC 登记号 CRL-1851)。

[0149] 将 CHO-K1 和 DHFR-CHO 细胞 DG44 和 DUK-B11(G. Urlaub, L. A. Chasin, 1980. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77, 4216-4220) 用于高水平的蛋白质生产,因为通过整合进可选择的、可扩增标记 DHFR,使用(例如)药物氨甲蝶呤(MTX)能够进行所关注的基因的扩增(R. J. Kaufman, 1990. Methods Enzymol. 185:537-566)。DHFR-CHO 细胞可以成功地用于以高水平生产重组 mAb。DHFR-CHO 可以 $80\text{--}110\text{mg } 10^6 \text{ 细胞}^{-1} \text{ 天}^{-1}$ 或超过 $200\text{mg } 10^6 \text{ 细胞}^{-1}$

天⁻¹的速率生产抗 MCP-1 抗体。多种启动子已用于在这些 CHO 细胞中获得 H- 链和 L- 链的表达,例如,b- 肌动蛋白启动子、人 CMV MIE 启动子、Ad 病毒主要晚期启动子 (MLP)、RSV 启动子和鼠白血病病毒 LTR。用于 mAb 表达的许多载体已在文献中有描述,其中 2 条 Ig 链由具有独立选择 / 可扩增标记的 2 种不同质粒携带。包含 1 条抗体链 (例如与 DHFR 标记连接的 H- 链) 和具有 Neo^r 标记的 L- 链表达盒或反之亦然载体可用于在旋转器瓶中获得最高达 180mg 的人源化 mAb L⁻¹ 7 天⁻¹。用于初始选择和后续扩增的方法可以有变化并且是本领域技术人员熟知的。通常,高水平的 mAb 表达可以使用如下步骤获得:候选克隆的初始选择和后续扩增,共选择 (例如在其中 H- 链和 L- 链表达载体都携带 DHFR 表达单位的情况下) 和扩增,使用不同可扩增标记的共扩增,以及在大量培养中初始选择和扩增,然后为稀释克隆法以鉴定个别高表达的克隆。因为整合位点可以影响 H- 链和 L- 链表达以及总体 mAb 表达的效率,所以已制备其中两个 Ig- 链表达单位串联设置的单个载体。这些载体还携带有显性选择标记,例如 Neo^r 和 DHFR 表达盒。关于综述,参见 Ganguly, S. 和 A. Shatzman. Expression Systems, mammalian cells IN: Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation. 1999 by John Wiley & Sons, Inc.

[0150] Cockett 等人 (1990. Bio/Technology 8, 662-667) 开发了 GS 系统用于在 CHO 细胞中高水平表达异源基因。将包含 cDNA (在 hCMV 启动子的转录控制下) 和 GS 小基因 (在 SV40 晚期启动子的控制下) 的表达载体转染进 CHO-K1 细胞内 (然后用 20mM 至 500mM 的 MSX 选择) 可用于产生表达本发明抗体的克隆,其产量与 DHFR-CHO 系统的产量相当。GS 系统整体或部分连同欧洲专利 No. 0 216846、No. 0 256 055 和 No. 0 323 997 以及欧洲专利申请 No. 89303964.4 进行讨论。

[0151] 作为非限制性实例,表达重组蛋白质的转基因烟草叶已成功地用于提供大量重组蛋白质,例如使用诱导型启动子。参见,例如 Cramer 等人, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 240 :95-118 (1999) 和其中引用的参考文献。同样,转基因玉米已用于以商业生产水平表达哺乳动物蛋白质,其生物活性等同于在其他重组系统中生产或从天然来源纯化的那些。参见,例如 Hood 等人, Adv. Exp. Med. Biol. 464 :127-147 (1999) 和其中引用的参考文献。也可由转基因植物种子 (包括烟草种子和马铃薯块茎) 大量生产抗体,包括抗体片段,例如单链抗体 (scFv)。参见,例如 Conrad 等人, Plant Mol. Biol. 38 :101-109 (1998) 和其中引用的参考文献。因此,本发明的抗体还可以使用转基因植物根据已知方法进行生产。还可参见,例如 Fischer 等人, Biotechnol. Appl. Biochem. 30 :99-108 (Oct., 1999), Ma 等人, Trends Biotechnol. 13 :522-7 (1995); Ma 等人, Plant Physiol. 109 :341-6 (1995); Whitelam 等人, Biochem. Soc. Trans. 22 :940-944 (1994); 以及其中引用的参考文献。关于抗体的植物表达一般还可参见 (但不限于) 美国专利 No. 5959177。上述参考文献各自以引用方式全文并入本文中。

[0152] 5. 抗体的纯化

[0153] 抗 MCP-1 抗体可以通过熟知的方法从重组细胞培养物中进行回收和纯化,所述方法包括 (但不限于) A 蛋白纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析法、疏水相互作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析。高效液相层析 (“HPLC”) 也可以用于纯化。参见,例如 Colligan, Current Protocols in Immunology 或 Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), 例

如第 1、4、6、8、9、10 章,各自以引用方式全文并入本文中。

[0154] 本发明的抗体包括天然纯化的产物、化学合成方法的产物和通过重组技术由真核宿主生产的产物,所述真核宿主包括(例如)酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞。根据重组生产方法中所使用的宿主,本发明的抗体可以是糖基化的或者可以是非糖基化的,而糖基化的是优选的。此类方法在许多标准实验室手册中有描述,例如 Sambrook,同上,第 17.37-17.42 节;Ausubel,同上,第 10、12、13、16、18 和 20 章,Colligan, ProteinScience,同上,第 12-14 章,所有参考文献都以引用方式全文并入本文中。

[0155] 6. 本发明的抗体

[0156] 可用于本发明的方法和组合物的抗 MCP-1 抗体(也称为抗 CCL-2 抗体或 MCP-1 抗体)可以任选表征为与 MCP-1 的高亲和力结合、与 MCP-1 的高特异性结合、抑制与 MCP-1 相关的一种或多种生物学活性的能力,以及任选和优选具有低毒性。

[0157] 本发明的抗体可以以广泛范围的亲和力(K_D)结合人 MCP-1。在一个优选的实施例中,本发明的至少一种人 mAb 可以任选以高亲和力结合人 MCP-1。例如,人 mAb 可以以等于或小于约 10^{-7} M 的 K_D 结合人 MCP-1,例如但不限于 $0.1-9.9$ (或其中的任何范围或值) $\times 10^{-7}$ 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} 、 10^{-13} 或其中的任何范围或值。

[0158] 抗体对于抗原的亲和力或亲和力可以使用任何合适的方法进行实验测定。(参见,例如 Berzofsky 等人,“Antibody-Antigen Interactions,”In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Rayen Press: New York, NY (1984); Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992); 和本文描述的方法)。如果在不同的条件(例如,盐浓度、pH)下测量,则测得的特定抗体-抗原相互作用的亲和力会不同。因此,亲和力和其他抗原结合参数(例如 K_D 、 K_a 、 K_d)的测量优选用抗体和抗原的标准溶液以及标准缓冲液(例如本文所述标准溶液和缓冲液)来进行。

[0159] 本发明的分离的抗体包含由任何合适的多核苷酸编码的本文所公开的抗体氨基酸序列,或任何分离的或制备的抗体。优选地,人抗体或抗原结合片段结合人 MCP-1,从而部分或基本上中和蛋白质的至少一种生物学活性。部分或优选基本上中和至少一种 MCP-1 蛋白或片段的至少一种生物学活性的抗体或其特定部分或变体可以结合蛋白质或片段,从而抑制通过 MCP-1 与 MCP-1 受体结合或通过其他 MCP-1 依赖性介导的机制介导的活性。如本文所用,术语“中和抗体”指取决于测定,可以使 MCP-1 依赖性活性被抑制达约 20-120% 的抗体,优选至少约 10、20、30、40、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100% 或更多。抗 MCP-1 抗体抑制 MCP-1 依赖性活性的能力优选通过本文所述的和/或本领域已知的至少一种合适的 MCP-1 蛋白或受体测定来进行评估。本发明的人抗体可以是任何种类(IgG、IgA、IgM、IgE、IgD 等)或同种型的,并且可包含 K 或 λ 轻链。在一个实施例中,人抗体包含 IgG 重链或限定片段,例如,至少一种同种型 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。这种类型的抗体可以如本文所述的和/或如本领域已知的通过使用转基因小鼠或其他转基因非人哺乳动物来制备,所述动物包含至少一种人轻链(例如 IgG、IgA 和 IgM,例如 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 、 $\gamma 3$ 、 $\gamma 4$) 转基因。在另一个实施例中,抗人 MCP-1 人抗体包含 IgG1 重链和 IgG1 轻链。

[0160] 本发明的至少一种抗体结合至少一种特定表位,该表位是至少一种 MCP-1 蛋白质、片段、部分或其任何组合特异性的。至少一种表位可包含至少一个包括蛋白质的至少一

部分的抗体结合区,该表位优选包含 SEQ ID NO :1 的邻接氨基酸的至少 1-3 个氨基酸至整个特定部分。

[0161] 一般来讲,本发明的人抗体或抗原结合片段将包含抗原结合区,该抗原结合区包含至少一个人互补决定区 (CDR1、CDR2 和 CDR3) 或至少一个重链可变区变体,以及至少一个人互补决定区 (CDR1、CDR2 和 CDR3) 或至少一个轻链可变区变体。作为非限制性实例,抗体或抗原结合部分或变体可包含至少一个具有 SEQ ID NO :9 或 12 的氨基酸序列的重链 CDR3,和/或具有 SEQ ID NO :15-17、20 或 21 的氨基酸序列的轻链 CDR3。在具体实施例中,抗体或抗原结合片段可以具有抗原结合区,所述抗原结合区包含具有相应 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 的氨基酸序列(例如 SEQ ID NO :6-12 和/或 22、23 和 26)的至少一个重链 CDR(即,CDR1、CDR2 和/或 CDR3)的至少一部分。在另一具体实施例中,抗体或抗原结合部分或变体可以具有抗原结合区,所述抗原结合区包含具有相应 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 的氨基酸序列(例如 SEQ ID NO :13-21 和/或 24 和 25)的至少一个轻链 CDR(即 CDR1、CDR2 和/或 CDR3)的至少一部分。在一个优选的实施例中,抗体或抗原结合片段的 3 个重链 CDR 和 3 个轻链 CDR 具有来源于如本文所述的 Fab MOR0336、MOR03464、MOR03468、MOR03470、MOR03471、MOR03473、MOR03548 中的至少一个的相应 CDR 的氨基酸序列,并且重链构架区来源于 VH3 抗体 (SEQ ID NO. 2),且轻链构架区来源于 K 型抗体 (SEQ ID NO. 4)。此类抗体可以通过下列方法制备:使用常规技术将抗体的各个部分 (CDR 和构架) 化学连接在一起,使用重组 DNA 技术的常规技术或通过使用任何其他合适的方法制备和表达编码抗体的核酸分子。

[0162] 抗 MCP-1 抗体可包含具有在构架区中限定氨基酸序列的至少一个重链或轻链可变区。例如,在一个优选的实施例中,抗 MCP-1 抗体包含任选具有 SEQ ID NO :2 或 3 的氨基酸序列的至少一个重链可变区和/或任选具有 SEQ ID NO :4 或 5 的氨基酸序列的至少一个轻链可变区中的至少一个。

[0163] 抗体种类或同种型 (IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgM) 被给予由重链恒定区基因编码的恒定区。在人 IgG 种类中,存在 4 个亚类或亚型: IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4,按照其在血清中的天然丰度从最高到最低的顺序命名。IgA 抗体发现了 2 个亚类: IgA1 和 IgA2。如本文所用,“同种型转换”也指 IgG 亚类或亚型之间的变化。

[0164] 本发明还涉及包含氨基酸序列的抗体、抗原结合片段、免疫球蛋白链和 CDR,所述氨基酸序列基本上与本文所述的氨基酸序列相同。优选地,此类抗体或抗原结合片段和包含此类链或 CDR 的抗体可以以高亲和力(例如小于或等于约 10^{-9} M 的 K_D) 结合人 MCP-1。基本上与本文所述序列相同的氨基酸序列包括包含保守氨基酸置换以及氨基酸缺失和/或插入的序列。保守氨基酸置换指用第二种氨基酸置换第一种氨基酸,所述第二种氨基酸具有的化学和/或物理性质(例如电荷、结构、极性、疏水性/亲水性)与第一种氨基酸的那些相似。保守置换包括将一种氨基酸用下列组内的另一种置换:赖氨酸 (K)、精氨酸 (R) 和组氨酸 (H);天冬氨酸 (D) 和谷氨酸 (E);天冬酰胺 (N)、谷氨酰胺 (Q)、丝氨酸 (S)、苏氨酸 (T)、酪氨酸 (Y)、K、R、H、D 和 E;丙氨酸 (A)、缬氨酸 (V)、亮氨酸 (L)、异亮氨酸 (I)、脯氨酸 (P)、苯丙氨酸 (F)、色氨酸 (W)、甲硫氨酸 (M)、半胱氨酸 (C) 和甘氨酸 (G);F、W 和 Y;C、S 和 T。

[0165] 本发明的抗 MCP-1 抗体可包括一种或多种来自自然突变或人为操纵的氨基酸置换、缺失或添加,如本文详细描述的或如 Knappik 等人的 US6828422 中所教导的关于来源于

人种系基因序列且通过序列相似性分类成命名为 VH1A、VH1B、VH2 等的家族,且通过轻链分类为 K 或 λ 亚群的可变区。可以在本发明中使用的这些序列和其他序列包括(但不限于)表 1 中呈现的构型,如于 2004 年 6 月 21 日提交的 PCT 公开 WO 05/005604 和 US10/872,932 的图 1-42 中进一步描述的,所述专利以引用方式全文并入本文中,其中参考的图 1-42 示出了重链和轻链可变结构域和恒定结构域序列、构架、亚结构域、区和置换的例子,所述部分可如本文教导用于本发明的 Ig 衍生蛋白质。

[0166] 表 1. 人抗体构型

[0167]

		区						
重链可变区		FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
轻链可变区		FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
IgA1、IgA2、IgD、IgG1、 IgG2、IgG3、IgG4	恒定区	CH1	铰链 1-4	CH2	CH3			
SIgA, IgM		CH1	铰链 1-4	CH2	CH3	J-链		
IgE		CH1		CH2	CH3	CH4		

[0168] 技术人员可以进行的氨基酸置换数取决于许多因素,包括上文所述的那些。一般来讲,对于任何给定的抗 MCP-1 抗体、片段或变体的氨基酸置换、插入或缺失数目将不超过 40、30、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个,例如 1-30 个或如本文指定的其中的任何范围或值。

[0169] 本发明抗 MCP-1 抗体中对功能必需的氨基酸可以通过本领域已知方法进行鉴定,例如定点诱变或丙氨酸扫描诱变(例如, Ausubel, 同上, 第 8、15 章; Cunningham 和 Wells, Science 244 :1081-1085 (1989))。后面的方法在分子的每个残基处引入单个丙氨酸突变。随后测试所得突变分子的生物学活性,例如但不限于至少一种 MCP-1 中和活性。对抗体结合关键的位点也可以通过结构分析进行鉴定,例如结晶、核磁共振或光亲和标记 (Smith 等人, J. Mol. Biol. 224 :899-904 (1992) 和 de Vos 等人, Science 255 :306-312 (1992))。

[0170] 本发明的抗 MCP-1 抗体可包括(但不限于)选自 SEQ ID NO :2-5 和 27-28 中至少一个的 5 至所有邻接氨基酸的至少一部分、序列或组合。

[0171] 抗 MCP-1 抗体还可任选包含 SEQ ID NO :27 和 28 中至少一个的多肽。在一个实施例中,如果没有不改变抗 MCP-1 抗体的结合特异性的保守置换,免疫球蛋白链的氨基酸序列或其部分与 SEQ ID NO :27-28 中至少一个的相应链的氨基酸序列具有约 100% 的同一性。例如,轻链可变区的氨基酸序列可以与 SEQ ID NO :4 或 5 的序列进行比较,或者重链的氨基酸序列可以与 SEQ ID NO :2 或 3 进行比较。优选地,氨基酸同一性使用如本领域已知的合适计算机算法进行测定。

[0172] 技术人员将会知道,本发明包括本发明的至少一种生物活性抗体。生物活性抗体的比活性为天然(非合成)、内源或相关和已知抗体比活性的至少 20%、30% 或 40%,并且优选为至少 50%、60% 或 70%,并且最优选为至少 80%、90% 或 95% -1000%。测定和定量测量酶促活性和底物特异性的方法是本领域技术人员熟知的且在本文中有描述。

[0173] 在另一方面,本发明涉及通过共价附着有机部分进行修饰的、如本文所述的人抗体和抗原结合片段。这种修饰可以产生具有改善的药物代谢动力学性质(例如增加的体内血清半衰期)的抗体或抗原结合片段。有机部分可以是线性或分支的亲水聚合基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。在具体实施例中,亲水聚合基团可以具有约 800 至约 120,000 道尔顿的分子量,并且可以是聚链烷二醇(例如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG))、碳水化合物聚合物、氨基酸聚合物或聚乙烯吡咯烷酮,并且脂肪酸或脂肪酸酯基团可包含约 8 至约 40 个碳原子。

[0174] 本发明的修饰的抗体和抗原结合片段可包含与抗体直接或间接共价结合的一个或多个有机部分。与本发明的抗体或抗原结合片段结合的每个有机部分可以独立地是亲水聚合基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。如本文所用,术语“脂肪酸”包括单羧酸和二羧酸。“亲水聚合基团”,该术语在本文中使用时是指在水中比在辛烷中更易溶的有机聚合物。例如,聚赖氨酸在水中比在辛烷中更易溶。因此,通过共价连接聚赖氨酸来修饰的抗体包括在本发明内。适用于修饰本发明抗体的亲水聚合物可以是直链或支链的,并且包括(例如)聚链烷二醇(例如 PEG、单甲氧基-聚乙二醇(mPEG)、PPG 等)、碳水化合物(例如葡聚糖、纤维素、寡糖、多糖等)、亲水性氨基酸聚合物(例如聚赖氨酸、聚精氨酸、聚天冬氨酸等)、聚环氧链烷(例如,聚环氧乙烷、聚环氧丙烷等)和聚乙烯吡咯烷酮。优选地,修饰本发明抗体的亲水聚合物作为单独的分子实体具有约 800 至约 150,000 道尔顿的分子量。例如可以使用 PEG₅₀₀₀ 和 PEG_{20,000},其中下标是以道尔顿表示的聚合物的平均分子量。亲水聚合基团可以由 1 至约 6 个烷基、脂肪酸或脂肪酸酯基团取代。由脂肪酸或脂肪酸酯基团取代的亲水聚合物可以通过采用合适的方法制备。例如,包含胺基的聚合物可以与脂肪酸或脂肪酸酯的羧基偶联,且脂肪酸或脂肪酸酯上的活化羧基(例如用 N,N'-羰基二咪唑活化)可以与聚合物上的羟基偶联。

[0175] 适用于修饰本发明抗体的脂肪酸和脂肪酸酯可以是饱和的或可包含一个或多个不饱和单位。适用于修饰本发明抗体的脂肪酸包括(例如)正十二烷酸(C₁₂,月桂酸)、正十四烷酸(C₁₄,肉豆蔻酸)、正十八烷酸(C₁₈,硬脂酸)、正二十烷酸(C₂₀,花生酸)、正二十二烷酸(C₂₂,山嵛酸)、正三十烷酸(C₃₀)、正四十烷酸(C₄₀)、顺式- Δ 9-十八烷酸(C₁₈,油酸)、全顺式- Δ 5,8,11,14-二十碳四烯酸(C₂₀,花生四烯酸)、辛二酸、十四烷二酸、十八烷二酸、二十二烷二酸等。合适的脂肪酸酯包括包含直链或支链的低级烷基的二羧酸单酯。低级烷基可包含 1 至约 12 个,优选 1 至约 6 个碳原子。

[0176] 修饰的人抗体和抗原结合片段可以使用合适的方法,例如通过与一种或多种改性剂反应来制备。“改性剂”,该术语在本文中使用时是指包含活化基团的合适有机基团(例如亲水聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯)。“活化基团”是化学部分或官能团,它们在合适条件下可与第二种化学基团反应,由此在改性剂和第二种化学基团之间形成共价键。例如,胺反应性活化基团包括亲电子基团,例如甲苯磺酸酯、甲磺酸酯、卤素(氯、溴、氟、碘)、N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS)等。可以与硫醇反应的活化基团包括(例如)马来酰亚胺、碘代乙酰基、丙烯酰基(acryloyl)、吡啶基二硫化物、5-硫醇-2-硝基苯甲酸硫醇(TNB-硫醇)等。醛官能团可以与含胺或酰胺的分子偶联,并且叠氮基可以与三价含磷基团反应以形成氨基磷酸酯或磷酸亚胺键。将活化基团引入分子的合适方法是本领域已知的(参见例如 Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, CA(1996))。活化基团可

以直接或通过连接部分与有机基团（例如亲水聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯）结合，所述连接部分例如为其中一个或多个碳原子可以由杂原子（例如氧、氮或硫）取代的二价 C_1-C_{12} 基团。合适的连接部分包括（例如）四乙二醇、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-NH-(CH_2)_6-NH-$ 、 $-(CH_2)_2-NH-$ 和 $-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH-NH-$ 。包含连接部分的改性剂可以（例如）通过如下产生：在 1-乙基-3-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺 (EDC) 存在的情况下，使单-Boc-烷基二胺（例如单-Boc-乙二胺、单-Boc-二氨基己烷）与脂肪酸反应，以在游离胺和脂肪酸羧基之间形成酰胺键。Boc 保护基团可以通过用三氟乙酸 (TFA) 处理来从产物中去除，以暴露伯胺，所述伯胺可以如所述的与另一羧基偶联，或者可以与马来酸酐反应，并且所得产物可以环化而产生脂肪酸的活化马来酰亚胺衍生物。（参见，例如 Tillompson 等人，WO 92/16221，其完整教导以引用方式并入本文中。）

[0177] 本发明的修饰抗体可以通过使人抗体或抗原结合片段与改性剂反应来产生。例如，有机部分可以通过使用胺反应性改性剂（例如 PEG 的 NHS 酯）以非位点特异性方式结合至抗体。修饰的人抗体或抗原结合片段还可以通过使抗体或抗原结合片段的二硫键（例如链内二硫键）还原来制备。还原的抗体或抗原结合片段随后可以与硫醇反应性改性剂反应以产生本发明的修饰抗体。包含有机部分的修饰的人抗体或抗原结合片段可以使用合适的方法制备，所述有机部分与本发明抗体的特定位点结合，所述方法例如为反向蛋白质水解 (reverse proteolysis) (Fisch 等人，Bioconjugate Chem., 3:147-153(1992)；Werlen 等人，Bioconjugate Chem., 5:411-417(1994)；Kumaran 等人，Protein Sci. 6(10):2233-2241(1997)；Itoh 等人，Bioorg. Chem., 24(1):59-68(1996)；Capellas 等人，Biotechnol. Bioeng., 56(4):456-463(1997))，以及在 Hermans on, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press; San Diego, CA(1996) 中描述的方法。

[0178] 7. 针对抗 MCP-1 抗体的抗独特型抗体

[0179] 除了单克隆或嵌合的抗 MCP-1 抗体之外，本发明还涉及对本发明的此类抗体特异的抗独特型（抗 Id）抗体。抗 Id 抗体是识别一般与另一种抗体的抗原结合区相关的独特决定簇的抗体。抗 Id 可以通过用抗体或其包含 CDR 的区域免疫与 Id 抗体来源相同的物种和遗传类型（例如小鼠品系）的动物来进行制备。被免疫动物将识别免疫抗体的独特型决定簇且对其应答，并产生抗 Id 抗体。抗 Id 抗体还可以用作“免疫原”以在另一动物中诱导免疫应答，从而产生所谓的抗-抗 Id 抗体。

[0180] 8. 包含另外的治疗活性成分的抗体组合物

[0181] 组合物还可以任选包含有效量的至少一种化合物或蛋白质，所述化合物或蛋白质选自皮肤病学药物、消炎药、止痛药、肾药（例如血管紧张素受体阻断剂 (ARB) 或拮抗剂）、抗感染药、心血管 (CV) 系统药物、中枢神经系统 (CNS) 药物、自主神经系统 (ANS) 药物、呼吸道药物、胃肠 (GI) 道药物、激素药物、用于流体或电解质平衡的药物、血液学药物、抗肿瘤药物、免疫调节药物、眼用药物、耳用药物或鼻用药物、局部用药物、营养药物等中的至少一种。此类药物是本领域熟知的，包括本文所提出的每一种药物的配制、适应症、给药和施用（参见，例如，Nursing 2001 Handbook of Drugs, 第 21 版，Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; HealthProfessional's Drug Guide 2001, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ; Pharmacotherapy Handbook, Wells 等人，ed., Appleton & Lange, Stamford, CT, 各自以引用方式全文并入本文中）。

[0182] 本发明的抗 MCP-1 抗体组合物还可包含任何合适的且有效量的组合物或药物组合物中的至少一种,所述组合物或药物组合物包含对于需要此类调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者的至少一种抗 MCP-1 抗体,任选还包含选自下列的至少一个:至少一种 TNF 拮抗剂(例如但不限于 TNF 化学或蛋白质拮抗剂、TNF 单克隆或多克隆抗体或片段、可溶性 TNF 受体(例如 p55、p70 或 p85)或其片段、融合多肽,或小分子 TNF 拮抗剂,例如, YNF 结合蛋白 I 或 II(TBP-1 或 TBP-II)、奈瑞莫单抗(nerelimomab)、英夫利昔单抗、entercept、CDP-571、CDP-870、阿非莫单抗、来那西普等),抗风湿药(例如氨甲蝶呤、醋硫葡金、葡糖硫金、硫唑嘌呤、etanercept、硫代苹果酸金钠、硫酸羟氯喹、来氟洛米、柳氮磺吡啶),肌肉松弛药,麻醉药,非类固醇消炎药(NSAID),止痛剂,麻醉剂,镇静剂,局部麻醉剂,神经肌肉阻断剂,抗微生物剂(例如氨基糖苷类、抗真菌剂、抗寄生物剂、抗病毒剂、碳青霉烯、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺胺药物、四环素、另一种抗微生物剂),抗牛皮癣剂,皮质类固醇,促蛋白合成类固醇,糖尿病相关剂,矿物质,营养物,甲状腺剂,维生素,钙相关激素,止泻剂,止咳药,止吐剂,抗溃疡药,缓泻药,抗凝剂,促红细胞生成素(例如重组人类红细胞生成素 a),非格司亭(例如 G-CSF,重组人粒细胞集落刺激因子),沙格司亭(GM-CSF,白细胞素),慢性阻塞性肺病(COPD)剂,抗纤维变性剂,免疫接种,免疫球蛋白,免疫抑制剂(例如 basiliximab、环孢菌素、daclizumab),生长激素,激素替代药物,雌激素受体调节剂,散瞳剂,睫状肌麻痹药,烷化剂,抗代谢物,有丝分裂抑制剂,防辐射药物,抗抑郁药,抗躁狂剂,抗精神病药,抗焦虑药,催眠药,拟交感神经药,兴奋剂,多奈哌齐,单满吡啶氨,哮喘药, β 激动剂,吸入类固醇,白细胞三烯抑制剂,甲基黄嘌呤,色甘酸,肾上腺素或类似物,阿法脱氧核糖核酸酶(Pulmozyme),细胞因子或细胞因子拮抗剂。此类细胞因子的非限制性实例包括(但不限于)IL-1 至 IL-29 中的任何一者。合适的剂量是本领域熟知的。参见,例如,Wells 等人(编辑),Pharmacotherapy Handbook,第2版,Appleton and Lange, Stamford, CT(2000);PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA(2000),所述参考文献各自以引用方式全文并入本文中。

[0183] 此类抗癌药或抗感染药还可包括与本发明的至少一种抗体缔合、结合、共配制或共施用的毒素分子。毒素可以任选起作用以选择性杀死病理性细胞或组织。病理性细胞可以是癌细胞或其他细胞。此类毒素可以是(但不限于)纯化或重组毒素或包含毒素的至少一个功能性细胞毒性结构域的毒素片段,例如选自蓖麻毒素、白喉毒素、毒液毒素或细菌毒素中的至少一种。术语毒素还包括由任何天然存在的、突变型或重组细菌或病毒产生的内毒素和外毒素,所述细菌或病毒可以在人和其他哺乳动物中引起任何病理状况,包括毒素休克,这可导致死亡。此类毒素可包括(但不限于)肠产毒性大肠杆菌热不稳定肠毒素(LT)、热稳定肠毒素(ST)、志贺氏菌属(Shigella)细胞毒素、气单胞菌属(Aeromonas)肠毒素,中毒性休克综合征毒素-1(TSST-1),葡萄球菌(Staphylococcal)肠毒素 A(SEA)、B(SEB)或 C(SEC)、链球菌(Streptococcal)肠毒素等。此类细菌包括(但不限于)下列物种的菌株:肠产毒性大肠杆菌(ETEC)、肠出血性大肠杆菌(例如血清型 O157:H7 菌株)、葡萄球菌属物种(例如金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)、化脓性葡萄球菌(Staphylococcus pyogenes))、志贺氏菌属物种(例如痢疾志贺氏菌(Shigella dysenteriae)、弗氏志贺氏菌(Shigella flexneri)、鲍氏志贺氏菌(Shigella

boydii) 和宋内氏志贺氏菌 (*Shigella sonnei*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*) 物种 (例如伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*)、猪霍乱沙门氏菌 (*Salmonella cholerae-suis*)、肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis*))、梭菌属 (*Clostridium*) 物种 (例如产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、艰难梭菌 (*Clostridium difficile*)、肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*))、*Camphlobacter* 物种 (例如 *Camphlobacter jejuni*、*Camphlobacter fetus*)、*Helicobacter* 物种 (例如 *Helicobacter pylori*)、气单胞菌属物种 (例如温和气单胞菌 (*Aeromonas sobria*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、豚鼠气单胞菌 (*Aeromonas caviae*))、*Plesiomonas shigelloides*、小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*)、弧菌属 (*Vibrios*) 物种 (例如霍乱弧菌 (*Vibrios cholerae*)、副溶血弧菌 (*Vibrios parahaemolyticus*))、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 物种、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和链球菌 (*Streptococci*)。参见, 例如 Stein (编辑), *INTERNAL MEDICINE*, 第 3 版, 第 1-13 页, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans 等人 (编辑), *Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control*, 第 2 版, 第 239-254 页, Plenum Medical Book Co., New York (1991); Mandell 等人, *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 第 3 版, Churchill Livingstone, New York (1990); Berkow 等人 (编辑), *The Merck Manual*, 第 16 版, Merck and Co., Rahway, N. J., 1992; Wood 等人, *FEMS Microbiology Immunology*, 76:121-134 (1991); Marrack 等人, *Science*, 248:705-711 (1990), 所述参考文献的内容以引用方式全文并入本文中。

[0184] 本发明的抗 MCP-1 抗体化合物、组合物或组合还可包含任何合适辅助剂中的至少一种, 例如 (但不限于) 稀释剂、粘合剂、稳定剂、缓冲剂、盐、亲脂性溶剂、防腐剂、佐剂等。可药用辅助剂是优选的。此类无菌溶液的非限制性例子和制备方法是本领域熟知的, 例如但不限于: Gennaro (编辑), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 第 18 版, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990。如本领域熟知的或如本文所述的, 可以常规选择适用于抗 MCP-1 抗体、片段或变体组合物的施用方式、溶解性和 / 或稳定性的可药用载体。

[0185] 在本组合物中有用的药学赋形剂和添加剂包括 (但不限于) 蛋白质、肽、氨基酸、脂质和碳水化合物 (例如糖, 包括单糖、二、三、四和寡糖; 衍生糖, 例如糖醇、糖醛酸、酯化糖等; 和多糖或糖聚合物), 它可以单独或组合存在, 单独或组合地构成 1-99.99 重量% 或体积%。示例性蛋白质赋形剂包括血清清蛋白, 例如人血清清蛋白 (HSA)、重组人清蛋白 (rHA)、明胶、酪蛋白等。也可以在缓冲能力方面起作用的代表性氨基酸 / 抗体组分包括丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、阿斯巴甜等。一种优选的氨基酸是甘氨酸。

[0186] 适合在本发明中使用的碳水化合物赋形剂包括 (例如) 单糖, 例如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等; 二糖, 例如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等; 多糖, 例如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、淀粉等; 和糖醇, 例如甘露糖醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇山梨糖醇 (山梨醇)、肌醇等。用于在本发明中使用的优选碳水化合物赋形剂是甘露糖醇、海藻糖和棉子糖。

[0187] 抗 MCP-1 抗体组合物还可包括缓冲剂或 pH 调节剂; 通常, 缓冲剂是由有机酸或碱制备的盐。代表性缓冲剂包括有机酸盐, 例如柠檬酸、抗坏血酸、葡糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸的盐; Tris, 盐酸三羟甲基氨基甲烷或磷酸盐缓冲剂。用于本发明组

合物的优选缓冲剂是有机酸盐,例如柠檬酸盐。

[0188] 此外,本发明的抗 MCP-1 抗体组合物可包括聚合赋形剂/添加剂,例如聚乙烯吡咯烷酮、聚蔗糖(聚合糖)、葡萄糖结合剂(例如环糊精,例如 2-羟丙基- β -环糊精)、聚乙二醇、调味剂、抗微生物剂、增甜剂、抗氧化剂、抗静电剂、表面活性剂(例如聚山梨醇酯,例如“TWEEN 20”和“TWEEN 80”)、脂质(例如磷脂、脂肪酸)、类固醇(例如胆固醇)和螯合剂(例如 EDTA)。

[0189] 适合在根据本发明的抗 MCP-1 抗体、部分或变体组合物中使用的这些和另外已知的药学赋形剂和/或添加剂是本领域已知的,例如,如在下列文献中列出的:“Remington: The Science & Practice of Pharmacy”,第 19 版,Williams & Williams, (1995),和“Physician's Desk Reference”,第 52 版,Medical Economics, Montvale, NJ (1998),所述参考文献的公开内容以引用方式全文并入本文中。优选的载体或赋形剂材料是碳水化合物(例如糖和糖醇)和缓冲剂(例如柠檬酸盐)或聚合剂。

[0190] 9. 制剂

[0191] 如上文指出的,本发明提供了适合于药学或兽医学用途的稳定制剂,其在可药用制剂中包含至少一种抗 MCP-1 抗体。

[0192] 如上文指出的,本发明提供了包含包装材料和至少一个小瓶的制品,所述小瓶包含至少一种抗 MCP-1 抗体与指定缓冲剂和/或防腐剂任选溶于水性稀释剂中的溶液,其中所述包装材料包含标明此类溶液可以在 1、2、3、4、5、6、9、12、18、20、24、30、36、40、48、54、60、66、72 小时或更长时间段内保存的标签。本发明进一步包含制品,其包含包装材料、包含冷干的至少一种抗 MCP-1 抗体的第一个小瓶和包含指定缓冲剂和/或防腐剂的水性稀释剂的第二个小瓶,其中所述包装材料包含指导患者在水性稀释剂中重构至少一种抗 MCP-1 抗体,以形成可以在 24 小时或更长时间段内保存的溶液的标签。

[0193] 如果在湿润/干燥系统中,那么本发明产品中的至少一种抗 MCP-1 抗体的范围包括重构后产生约 1.0g/ml 至约 1000mg/ml 的浓度的量,但是更低和更高的浓度是可行的并且取决于计划的递送载体,例如溶液制剂将不同于经皮贴剂、肺、跨粘膜或渗透或微量泵方法。

[0194] 水性稀释剂还任选包含可药用防腐剂。优选的防腐剂包括选自由如下物质组成的组:苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸烷基酯(alkylparaben)(甲基酯、乙基酯、丙基酯、丁基酯等)、烷基苄基二甲基氯化铵、氯化苄乙氧铵、脱氢乙酸钠和硫柳汞或其混合物。在制剂中使用的防腐剂的浓度是足以产生抗微生物作用的浓度。该浓度取决于所选防腐剂且容易被技术人员确定。

[0195] 其他赋形剂例如等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、防腐剂增强剂,可以是任选的并且优选加入稀释剂中。等渗剂如甘油常常以已知浓度使用。优选加入生理学耐受的缓冲剂以提供改善的 pH 控制。制剂可以覆盖宽的 pH 范围,例如约 pH 4 至约 pH 10,并且优选的范围是约 pH 5 至约 pH 9,并且最优选的范围是约 6.0 至约 8.0。优选本发明的制剂具有约 6.8 至约 7.8 的 pH。优选的缓冲剂包括磷酸盐缓冲剂,最优选为磷酸钠,特别是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0196] 可以将其他添加剂例如可药用增溶剂如 Tween 20(聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐单月桂酸酯)、Tween 40(聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐单棕榈酸酯)、Tween 80(聚氧乙烯(20)

山梨糖醇酐单油酸酯)、Pluronic F68(聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物)和PEG(聚乙二醇)或非离子表面活性剂如聚山梨醇酯 20 或 80 或泊洛沙姆 184 或 188、**Pluronic**[®] polyls、其他嵌段共聚物,以及螯合剂如 EDTA 和 EGTA 任选加入制剂或组合物中以减少聚集。如果使用泵或塑料容器施用制剂,则这些添加剂是特别有用的。可药用表面活性剂的存在减轻了蛋白质聚集的倾向。

[0197] 本发明的制剂可以通过如下方法制备,所述方法包括使至少一种抗 MCP-1 抗体和缓冲溶液以足够提供所需浓度的蛋白质的量混合。这种方法的变型形式将是本领域普通技术人员可认识到的。例如,组分添加的顺序、是否使用另外的添加剂、制剂制备时的温度和 pH 都是可以对使用的浓度和施用方式进行最优化的因素。

[0198] 受权利要求书保护的制剂可以作为溶液或作为双小瓶提供给患者,所述双小瓶包含一小瓶冷干的至少一种抗 MCP-1 抗体,所述抗体用第二个小瓶重构,所述第二个小瓶包含在水性稀释剂中的水、防腐剂和 / 或赋形剂,优选磷酸盐缓冲液和 / 或盐水和所选盐。单个溶液小瓶或需要重构的双小瓶都可以多次再使用,并且可以满足患者治疗的单个或多个循环,且因此可以提供比目前可用的更方便的治疗方案。

[0199] 本发明受权利要求书保护的制品对于在立即 24 小时或更长时间段内的施用而言是有用的。因此,本发明受权利要求书保护的制品提供了对于患者而言的明显优点。本发明的制剂可以任选安全地贮存于约 2 至约 40℃ 的温度,并且使蛋白质的生物活性保持延长的时间段,从而允许包装标签标明溶液可以保持和 / 或在 6、12、18、24、36、48、72 或 96 小时或更长的时间段内使用。如果使用防腐的稀释剂,则此类标签可包括最高达 1-12 个月、半年、一年半和 / 或 2 年的使用。

[0200] 受权利要求书保护的产品可以通过提供给药房、门诊或其他此类协会和机构澄清的溶液剂或双小瓶来间接地提供给患者,所述双小瓶包含一小瓶冷干的至少一种抗 MCP-1 抗体,所述抗体用包含水性稀释剂的第二个小瓶重构。在这种情况下澄清溶液剂的容积大小可以是高达 1 升或甚至更大,从而提供较大储库(reservoirs),较小部分的至少一种抗体溶液可以从其中一次或多次取出用于转移到较小的小瓶内,且通过药房或门诊提供给它们的顾客和 / 或患者。

[0201] 具有这些单小瓶系统的公认的装置包括用于递送溶液剂的那些笔式注射器装置,例如 BD Pens、BD Autojector[®]、Humaject[®]、NovoPen[®]、B-D[®]Pen、AutoPen[®] 和 OptiPen[®]、GenotropinPen[®]、Genotronorm Pen[®]、Humatro Pen[®]、Reco-Pen[®]、Roferon Pen[®]、Biojector[®]、Iject[®]、J-tip Needle-Free Injector[®]、Intraject[®]、Medi-Ject[®], 例如由 BectonDickensen(Franklin Lakes, NJ, www.bectondickenson.com)、Disetronic(Burgdorf, Switzerland, www.disetronic.com); Bioject, Portland, Oregon(www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical(Peterborough, UK, www.weston-medical.com)、Medi-Ject Corp(Minneapolis, MN, www.mediject.com) 制备或开发的。具有双小瓶系统的公认的装置包括用于在药筒中重构冷干药物用于递送重构溶液剂的那些笔式注射器系统,例如 HumatroPen[®]。

[0202] 本发明受权利要求书保护的产品包括包装材料。包装材料除了提供管理机构要求的信息之外,还提供了产品可以在其中使用的条件。对于双小瓶、湿润 / 干燥产品,本发

明的包装材料提供了患者在水稀释剂中重构至少一种抗 MCP-1 抗体以形成溶液,且在 2-24 小时或更长时间段内使用溶液的说明书。对于单小瓶溶液产品,标签标明此类溶液可以在 2-24 小时或更长时间段内使用。本发明受权利要求书保护的产品对于人药产品使用而言是有用的。

[0203] 稳定抗 MCP-1 抗体的其他制剂或方法可以导致不同于包含所述抗体的冷干粉末的澄清溶液。在非澄清溶液中的是包含颗粒悬浮液的制剂,所述颗粒是包含可变尺寸结构的抗 MCP-1 抗体的组合物,且名称不一地称为微球体、微粒、纳米颗粒、纳米球体或脂质体。如 U. S. 4, 589, 330 中教导的,包含活性剂的此类相对同质的、基本上为球形的颗粒制剂可以通过下列方法形成:使包含活性物和聚合物的水相与非水相接触,然后蒸发非水相以导致颗粒从水相凝聚。如 U. S. 4, 818, 542 中教导的,多孔微粒可以通过如下制备:使用包含分散于连续溶剂中的活性物和聚合物的第一相,通过冷干或稀释-提取-沉淀从悬浮液中去除所述溶剂。用于此类制剂的优选聚合物是天然或合成共聚物或聚合物,它们选自由如下物质组成的组:明胶琼脂、淀粉、阿拉伯半乳聚糖、清蛋白、胶原、聚乙醇酸、聚乳酸、乙交酯-L(-)丙交酯聚(ε-己内酯、ε-己内酯-乳酸共聚物、ε-己内酯-乙醇酸共聚物、聚(β-羟基丁酸)、聚氧化乙烷、聚乙烯、聚(烷基-2-氰基丙烯酸酯)、聚(甲基丙烯酸羟乙酯)、聚酰胺、聚(氨基酸)、聚(2-羟乙基 DL-天冬酰胺)、聚(酯脲)、聚(L-苯丙氨酸/乙二醇/1,6-二异氰酸己烷)和聚(甲基丙烯酸甲酯)。特别优选的聚合物是聚酯,例如聚乙醇酸、聚乳酸、乙交酯-L(-)丙交酯聚(ε-己内酯、ε-己内酯-乳酸共聚物和 ε-己内酯-乙醇酸共聚物。对溶解聚合物和/或活性物有用的溶剂包括:水、六氟异丙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、己烷、苯或六氟丙酮倍半水合物。分散包含活性物的相与第二相的方法可包括施加压力从而迫使所述第一相通过喷嘴中的孔口而影响小滴形成。

[0204] 干粉制剂可以由不同于冷干的方法产生,例如通过喷雾干燥或通过蒸发提取溶剂产生,或者通过沉淀结晶组合物,然后通过一个或多个步骤来去除水性或非水性溶剂而产生。喷雾干燥的抗体制剂的制备在 U. S. 6, 019, 968 中有教导。基于抗体的干粉组合物可以通过在一定条件下喷雾干燥溶于溶剂的抗体和任选赋形剂的溶液或浆液,以提供可吸入干粉来生产。溶剂可包括容易干燥的极性化合物,例如水和乙醇。抗体的稳定性可以通过在不存在氧的情况下,例如在氮气层下或通过使用氮作为干燥气体进行喷雾干燥操作而得到增强。如 WO 9916419 中所教导的,另一种相对干燥的制剂是分散于悬浮介质中的许多有孔微结构的分散剂,所述悬浮介质一般包含氢氟烷推进剂。稳定化的分散剂可以使用定量吸入器施用至患者的肺。在喷雾干燥药物的商业制备中有用的设备由 Buchi Ltd. 或 Niro Corp 制造。

[0205] 本文所述的在稳定或防腐制剂或溶液中的至少一种抗 MCP-1 抗体可以依照本发明经由多种递送方法施用至患者,所述递送方法包括如本领域熟知的 SC 或 IM 注射;透皮、肺、跨粘膜、植入、渗透泵、药筒、微型泵或技术人员理解的其他手段。

[0206] 10. 治疗应用

[0207] 本发明还提供了使用至少一种本发明的 MCP-1 抗体调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种 MCP-1 相关疾病的方法,如本领域已知的或如本文所述的。本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种 MCP-1 相关疾病的方法,所述疾病包括(但不限于)恶性疾病、代谢疾病、免疫或炎症相关疾病、心血管疾病、

传染病或神经疾病中的至少一种。

[0208] 此类病症选自（但不限于）由细胞粘附和 / 或血管发生介导的疾病或病症。此类疾病或病症包括免疫障碍或疾病，心血管障碍或疾病，传染性、恶性和 / 或神经障碍或疾病，或其他已知或特定的 MCP-1 相关病症。特别地，抗体可用于治疗下列疾病，所述疾病涉及血管发生，例如眼疾病和肿瘤性疾病，涉及组织重建例如再狭窄，以及涉及某些细胞类型的增殖，特别是上皮和鳞状细胞癌。具体适应症包括在动脉粥样硬化、再狭窄、癌症转移、类风湿性关节炎、糖尿病性视网膜病和黄斑变性治疗中的用途。本发明的中和抗体还可用于预防或治疗不希望的骨再吸收或降解，例如如骨质疏松症中所发现的或由某些肿瘤过表达 PTHrP 而引起的。抗体还可用于治疗多种纤维变性疾病，例如特发性肺纤维变性、糖尿病肾病、肝炎和肝硬化。

[0209] 因此，本发明提供了使用至少一种本发明的 MCP-1 抗体调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种 MCP-1 相关疾病的方法，如本领域已知的或如本文所述的。具体适应症在下文讨论：

[0210] 肺部疾病

[0211] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种恶性疾病的方法，所述恶性疾病包括（但不限于）下列疾病中的至少一种：肺炎；肺脓肿；由粉尘、气体或薄雾形式的试剂引起的职业性肺部疾病；哮喘，闭塞性纤维性细支气管炎，呼吸衰竭，肺的超敏感性疾病包括超敏感性肺炎（外源性变应性肺泡炎），变应性支气管肺曲霉病，和药物反应；成人呼吸窘迫综合征（ARDS），Goodpasture 氏综合征，慢性阻塞性气道病症（COPD），特发性间质性肺病例如特发性肺纤维变性和结节病，脱屑性间质性肺炎，急性间质性肺炎，呼吸细支气管炎相关性间质性肺病，含机化性肺炎的特发性闭塞性细支气管炎，淋巴细胞性间质性肺炎，郎格汉斯细胞肉芽肿病，特发性肺含铁血黄素沉积症；急性支气管炎，肺泡蛋白沉积症，支气管扩张，胸膜病症，肺膨胀不全，囊性纤维变性，以及肺肿瘤和肺栓塞。

[0212] 恶性疾病

[0213] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种恶性疾病的方法，所述恶性疾病包括（但不限于）下列疾病中的至少一种：白血病，急性白血病，急性成淋巴细胞性白血病（ALL），B- 细胞、T 细胞或 FAB ALL，急性髓细胞样白血病（AML），慢性髓细胞性白血病（CML），慢性淋巴细胞性白血病（CLL），毛细胞性白血病，骨髓异常增生综合征（MDS），淋巴瘤，何杰金病，恶性淋巴瘤，非何杰金淋巴瘤，Burkitt 氏淋巴瘤，多发性骨髓瘤，卡波西肉瘤，结肠直肠癌，胰腺癌，肾细胞癌，乳腺癌，鼻咽癌，恶性组织细胞增多症，恶性肿瘤的肿瘤相关综合征 / 高血钙综合征，实体瘤，腺癌，鳞状细胞癌，肉瘤，恶性黑素瘤，特别是转移性黑素瘤，血管瘤，转移性疾病，癌症相关的骨再吸收，癌症相关的骨痛等。

[0214] 免疫相关疾病

[0215] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种免疫相关疾病的方法，所述免疫相关疾病包括（但不限于）下列疾病中的至少一种：类风湿性关节炎、青少年类风湿性关节炎、全身性发作的青少年类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎、强直性脊柱炎、胃溃疡、血清阴性关节病、骨关节炎、炎性肠病、溃疡性结肠炎、全身性红斑

狼疮、抗磷脂综合征、虹膜睫状体炎 / 葡萄膜炎 / 视神经炎、特发性肺纤维变性、系统性脉管炎 / 韦格纳肉芽肿病、结节病、睾丸炎 / 输精管切除术逆向操作 (vasectomy reversal procedures)、变应性 / 特应性疾病、哮喘、变应性鼻炎、湿疹、变应性接触性皮炎、变应性结膜炎、超敏感性肺炎、移植、器官移植排斥、移植物抗宿主病、全身性炎症反应综合征、脓毒症综合征、革兰氏阳性脓毒症、革兰氏阴性脓毒症、培养物阴性脓毒症、真菌性脓毒症、嗜中性白细胞减少性发热、尿脓毒症、脑膜炎球菌血症、外伤 / 出血、灼伤、电离射线暴露、急性胰腺炎、成人呼吸窘迫综合征、类风湿性关节炎、酒精诱导的肝炎、慢性炎症病理状态、结节病、克隆氏病理状态、镰状细胞贫血、糖尿病、肾病、特应性疾病、超敏反应、变应性鼻炎、枯草热、常年性鼻炎、结膜炎、子宫内膜异位、哮喘、荨麻疹、全身性过敏反应、皮炎、恶性贫血、溶血病、血小板减少症、任何器官或组织的移植排斥、肾移植排斥、心脏移植排斥、肝移植排斥、胰移植排斥、肺移植排斥、骨髓移植 (BMT) 排斥、皮肤同种异体移植排斥、软骨移植排斥、骨移植排斥、小肠移植排斥、胎儿胸腺植入物排斥、甲状旁腺移植排斥、任何器官或组织的异种移植排斥、同种异体移植排斥、抗受体超敏反应、格雷夫斯病、雷诺病、B 型胰岛素抗性糖尿病、哮喘、重症肌无力、抗体介导的细胞毒性、III 型超敏反应、全身性红斑狼疮、POEMS 综合征 (多发性神经病、器官巨大症、内分泌病、单克隆丙种球蛋白病和皮肤改变综合征)、多发性神经病、器官巨大症、内分泌病、单克隆丙种球蛋白病、皮肤改变综合征、抗磷脂综合征、天疱疮、硬皮病、混合型结缔组织病、特发性艾迪生病、糖尿病、慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬变、白癜风、脉管炎、MI 后心切手术综合征、IV 型超敏反应、接触性皮炎、超敏感性肺炎、同种异体移植排斥、胞内生物导致的肉芽瘤、药物敏感性、新陈代谢 / 特发性、威尔逊病、血色素沉着、 α -1 抗胰蛋白酶缺乏、糖尿病性视网膜病、桥本甲状腺炎、骨质疏松症、下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴评估、原发性胆汁性肝硬变、甲状腺炎、脑脊髓炎、恶病质、囊性纤维变性、新生儿慢性肺疾病、慢性阻塞性肺病 (COPD)、家族性噬血细胞淋巴瘤组织细胞增生症、皮肤病症、牛皮癣、秃头、肾病综合征、肾炎、肾小球性肾炎、急性肾衰竭、血液透析、尿毒症、毒性、先兆子痫、OKT3 疗法、抗 CD3 疗法、细胞因子疗法、化学疗法、放射疗法 (例如包括但不限于无力、贫血、恶病质等)、慢性水杨酸中毒等。参见, 例如 Merck Manual, 第 12-17 版, Merck & 公司, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells 等人 (编辑), 第二版, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000), 各自全文以引用方式并入。

[0216] 心血管疾病

[0217] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种心血管疾病的方法, 所述心血管疾病包括 (但不限于) 下列疾病中的至少一种: 心脏震昏综合征、心肌梗死、充血性心力衰竭、中风、缺血性中风、出血、动脉硬化症、动脉粥样硬化、再狭窄、糖尿病性动脉硬化病、高血压、动脉高压、肾血管性高血压、昏厥、休克、心血管系统梅毒、心力衰竭、肺源性心脏病、原发性肺动脉高压、心律失常、心房异位搏动、心房扑动、心房纤颤 (持续或阵发性)、灌注后综合征、心肺分流术炎症反应、紊乱性或多源性房性心动过速、规则狭窄性 QRS 心动过速、特殊心律失常、心室纤颤、希氏束性心律失常、房室传导阻滞、束支传导阻滞、心肌缺血性病症、冠状动脉病、心绞痛、心肌梗死、心肌病、扩张性充血性心肌病、限制性心肌病、瓣膜心脏病、心内膜炎、心包病、心脏肿瘤、主动脉和周围性动脉瘤、主动脉壁夹层形成、主动脉炎症、腹主动脉及其分支阻塞、外周血管病症、阻塞性动脉病症、

外周动脉粥样硬化病、血栓闭塞性血管炎、功能性外周动脉病症、Ravnaud 氏现象和疾病、手足发绀、红斑性肢痛病、静脉疾病、静脉血栓形成、曲张静脉、动静脉瘘、淋巴水肿、脂肪水肿、不稳定心绞痛、再灌注损伤、泵后综合征 (post pump syndrome)、缺血 - 再灌注损伤等。此类方法可以任选包括给需要此类调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者施用有效量的包含至少一种抗 MCP-1 抗体的组合物或药物组合物。

[0218] 神经疾病

[0219] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种神经疾病的方法,所述神经疾病包括(但不限于)下列疾病中的至少一种:神经变性疾病,多发性硬化,偏头痛,AIDS 痴呆综合征,脱髓鞘性病,例如多发性硬化和急性横贯性脊髓炎;锥体束外和小脑病症,例如脊髓皮质系统损害;基底神经节病症或小脑病症;运动机能亢进性运动障碍,例如亨廷顿舞蹈病和老年性舞蹈病;药物诱发的运动失调,例如由阻断 CNS 多巴胺受体的药物诱导的那些;运动机能减退性运动失调,例如帕金森病;进行性核上麻痹;小脑结构损害;脊髓小脑变性,例如脊髓性共济失调、弗里德赖希共济失调、小脑皮质变性、多系统变性 (Mencel、Dejerine-Thomas、Shi-Drager 和 Machado-Joseph);全身病症(雷弗素姆氏病、血 β 脂蛋白缺乏症)、共济失调、毛细血管扩张和线粒体多系统病症);脱髓鞘核心病症,例如多发性硬化、急性横贯性脊髓炎;以及运动单位病症,例如神经原性肌萎缩(前角细胞变性,例如肌萎缩性侧索硬化症、婴儿脊髓性肌萎缩和青少年脊髓性肌萎缩);阿尔茨海默氏病;中年唐氏综合征;弥散性 Lewy 体疾病;Lewy 体型老年性痴呆;韦 - 柯二氏综合征;慢性酒精中毒;克雅氏病;亚急性硬化性全脑炎、哈 - 斯二氏病;和拳击员痴呆等。此类方法可以任选包括给需要此类调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者施用有效量的包含至少一种 TNF 抗体或特定部分或变体的组合物或药物组合物。参见,例如 Merck Manual,第 16 版,Merck & 公司, Rahway, NJ (1992)。

[0220] 纤维变性病症

[0221] 除了上述病症和疾病之外,本发明还提供了用于调节或治疗各种病因的纤维变性病症的方法,例如肝纤维变性(包括但不限于酒精诱发的肝硬化、病毒诱发的肝硬化、自身免疫诱发的肝炎);肺纤维变性(包括但不限于硬皮病、特发性肺纤维变性);肾纤维变性(包括但不限于硬皮病、糖尿病性肾炎、肾小球肾炎、狼疮肾炎);皮肤纤维变性(包括但不限于硬皮病、肥大性和瘢痕疙瘩性瘢痕形成、灼伤);骨髓纤维变性;神经纤维瘤病;纤维瘤;肠纤维变性;和由外科手术操作引起的纤维变性粘连。

[0222] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种创伤、外伤或组织损伤或由其产生或与其相关的慢性病症的方法,包括(但不限于)下列病症中的任何一种:身体损伤或与外科手术相关的外伤,所述手术包括胸、腹、颅或口腔外科手术;或其中所述创伤选自由无菌创伤、挫伤、割伤、撕裂伤、非穿透伤、开放性创伤、穿透伤、贯通伤、刺伤、染毒创伤、梗塞形成和皮下创伤组成的组;或其中所述创伤选自由缺血性溃疡、褥疮、瘰、严重咬伤、热灼伤和供体部位创伤组成的组;或其中所述创伤是口疮创伤、外伤性创伤或疱疹相关创伤。供体部位创伤是(例如)与从身体的一个部分切除硬组织至身体的另一部分有关的,例如与移植有关发生的创伤。由此类手术产生的创伤是非常疼痛的,因此改善愈合是最有价值的。创伤纤维变性也顺应抗 MCP-1 抗体疗法,因为侵袭创伤区域的第一种细胞是嗜中性粒细胞,随后为由巨噬细胞活化的单核细胞。巨噬细胞被认为是

效的创伤愈合所必需的,因为它们还负责病原性生物的吞噬作用和清除组织碎片。此外,它们释放涉及后续愈合过程事件的众多因子。巨噬细胞吸引起始胶原产生的成纤维细胞。几乎所有组织修复过程都包括早期结缔组织形成,该形成以及后续过程的刺激可改善组织愈合,然而,结缔组织和胶原的超量产生会导致表征为非弹性和含氧量低的纤维变性组织。本发明的抗 MCP-1 抗体可以在用于调节、治疗或预防此类创伤愈合后遗症的方法中使用。

[0223] 本发明的抗体还可以在用于调节或治疗移植器官、组织或细胞(例如心脏移植)而引起的至少一种慢性排斥反应症状的方法中使用。

[0224] 抗 MCP-1 抗体的其他治疗用途

[0225] 本发明还提供了用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种传染病的方法,所述传染病包括但不限于下列疾病中的至少一种:急性或慢性细菌感染,急性和慢性寄生或传染过程,包括细菌、病毒和真菌感染,HIV 感染/HIV 神经病,脑膜炎,肝炎(甲型、乙型或丙型等),脓毒性关节炎,腹膜炎,肺炎,会厌炎,大肠杆菌 0157:h7,溶血尿毒症综合征/溶解血栓性血小板减少性紫癜,疟疾,登革出血热,利什曼病,麻风病,中毒性休克综合征,链球菌性肌炎,气性坏疽,结核分枝杆菌,细胞内鸟分枝杆菌,卡氏肺囊虫性肺炎,骨盆炎症性疾病,睾丸炎/附睾炎,军团杆菌,莱姆氏病,a 型流行性感冒,EB 病毒,病毒性脑炎/无菌性脑膜炎等。

[0226] 本发明的任何方法都可包括给需要此类调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者施用有效量的包含至少一种抗 MCP1 抗体的组合物或药物组合物。此类方法还可以任选为选自下列的至少一种:至少一种 TNF 拮抗剂(例如但不限于 TNF 抗体或片段,可溶性 TNF 受体或其片段、融合蛋白或小分子 TNF 拮抗剂),抗风湿药(例如氨甲蝶呤、醋硫葡金、葡糖硫金、硫唑嘌呤、依那西普、硫代苹果酸金钠、硫酸羟氯喹、来氟洛米、柳氮磺吡啶),肌肉松弛药,麻醉药,非类固醇消炎药(NSAID),止痛剂,麻醉剂,镇静剂,局部麻醉剂,神经肌肉阻断剂,抗微生物剂(例如氨基糖苷类、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、碳青霉烯、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺胺药物、四环素、另一种抗微生物剂),抗牛皮癣剂,皮质类固醇(地塞米松),促蛋白合成类固醇(睾酮),糖尿病相关剂,矿物质,营养物,甲状腺剂,维生素,钙相关激素,止泻剂,止咳药,止吐剂,抗溃疡药,缓泻药,抗凝剂,促红细胞生成素(例如重组人类红细胞生成素 α),非格司亭(例如 G-CSF,重组人粒细胞集落刺激因子),沙格司亭(GM-CSF,白细胞素),免疫接种,免疫球蛋白(利妥昔单抗),免疫抑制剂(例如巴利昔单抗、环孢菌素、达克珠单抗),生长激素,激素拮抗剂,生殖激素拮抗剂(氟利坦、尼鲁米特),激素释放调节剂(亮丙瑞林,性瑞林),激素替代药物,雌激素受体调节剂(他莫西芬),类视黄醇(维甲酸),拓扑异构酶抑制剂(依托泊苷、依立替康),cytotoxin(阿霉素),散瞳剂,睫状肌麻痹药,烷化剂(卡铂),氮芥(美法仑,苯丁酸氮芥(chlorabucil)),亚硝基脲(卡莫司汀、雌莫司汀),抗代谢物(氨甲蝶呤、阿糖胞苷、氟尿嘧啶),有丝分裂抑制剂(长春新碱、紫杉醇),防辐射药物(碘 131- 托西莫单抗),辐射敏化剂(米索硝唑、替拉扎明),抗抑郁药,抗躁狂剂,抗精神病药,抗焦虑药,催眠药,拟交感神经药,兴奋剂,多奈哌齐,单满吡啶氨,哮喘药, β 激动剂,吸入类固醇,白细胞三烯抑制剂,甲基黄嘌呤,色甘酸,肾上腺素或类似物,阿法脱氧核糖核酸酶(Pulmozyme),细胞因子(干扰素 α -2、IL-2)或细胞因子拮抗剂(英夫利昔单抗)。合适的剂量是本领域熟知的。参见,例如,Wells 等人(编辑),Pharmacotherapy Handbook,第 2 版,Appleton and Lange,

Stamford, CT(2000) ;PDR Pharmacopoeia, Tarascon PocketPharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, LomaLinda, CA(2000), 所述参考文献各自以引用方式全文并入本文中。

[0227] 用于治疗肿瘤性疾病的具体组合包括通过在抗肿瘤药施用之前、之时和 / 或之后共施用或组合治疗, 所述抗肿瘤药例如为烷化剂、氮芥、亚硝基脲 (nitrosurea)、抗生素、抗代谢物、激素激动剂或拮抗剂、免疫调节剂等。对于在转移性黑素瘤和其他肿瘤性疾病中的使用, 优选的组合是将抗体与氮烯咪胺、干扰素 α 、白细胞介素 -2、替莫唑胺、顺铂、长春碱、甲磺酸伊马替尼、卡莫司汀、紫杉醇等共施用。对于转移性黑素瘤, 氮烯咪胺是优选的。

[0228] 11. 施用剂量和方法

[0229] 本发明的方法可包括用于治疗 MCP-1 介导的障碍的方法, 包括给需要此类调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者施用有效量的包含至少一种抗 MCP-1 抗体的组合物或药物组合物。此类方法还可以任选包括用于治疗此类疾病或障碍的共施用或组合治疗, 其中所述至少一种抗 MCP-1 抗体、其特定部分或变体的施用还包括在选自下列的至少一种药物的施用之前、之时和 / 或之后施用: 肾药、皮肤病学 (dermatological) 药物、抗血管生成药、抗感染药, 心血管 (CV) 系统药物, 中枢神经系统 (CNS) 药物, 自主神经系统 (ANS) 药物, 呼吸道药物, 胃肠 (GI) 道药物, 激素药物, 用于流体或电解质平衡的药物, 血液学药物, 抗癌药, 免疫调节药物, 眼用药物、耳用药物或鼻用药物, 局部药物, 营养药物等, 至少一种 TNF 拮抗剂 (例如但不限于 TNF 抗体或片段, 可溶性 TNF 受体或其片段、融合蛋白或小分子 TNF 拮抗剂), 抗风湿药 (例如氨甲蝶呤、醋硫葡金、葡糖硫金、硫唑嘌呤、依那西普、硫代苹果酸金钠、硫酸羟氯喹、来氟洛米、柳氮磺吡啶), 肌肉松弛药, 麻醉药, 非类固醇消炎药 (NSAID), 止痛剂, 麻醉剂, 镇静剂, 局部麻醉剂, 神经肌肉阻断剂, 抗微生物剂 (例如氨基糖苷类、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、碳青霉烯、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺胺药物、四环素、另一种抗微生物剂), 抗牛皮癣剂, 皮质类固醇, 促蛋白合成类固醇, 糖尿病相关剂, 矿物质, 营养物, 甲状腺剂, 维生素, 钙相关激素, 止泻剂, 止咳药, 止吐剂, 抗溃疡药, 缓泻药, 抗凝剂, 促红细胞生成素 (例如重组人类红细胞生成素 α), 非格司亭 (例如 G-CSF, 重组人粒细胞集落刺激因子), 沙格司亭 (GM-CSF, 白细胞素), 免疫接种, 免疫球蛋白, 免疫抑制剂 (例如巴利昔单抗、环孢菌素、达克珠单抗), 生长激素, 激素替代药物, 雌激素受体调节剂, 散瞳剂, 睫状肌麻痹药, 烷化剂, 抗代谢物, 有丝分裂抑制剂, 防辐射药物, 抗抑郁药, 抗躁狂剂, 抗精神病药, 抗焦虑药, 催眠药, 拟交感神经药, 兴奋剂, 多奈哌齐, 甲满吡啶氨, 哮喘药, β 激动剂, 吸入类固醇, 白细胞三烯抑制剂, 甲基黄嘌呤, 色甘酸, 肾上腺素或类似物, 阿法脱氧核糖核酸酶 (Pulmozyme), 细胞因子或细胞因子拮抗剂。此类药物是本领域熟知的, 包括本文所提出的每一种药物的配制、适应症、给药和施用 (参见, 例如, Nursing 2001 Handbook of Drugs, 第 21 版, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; HealthProfessional's Drug Guide 2001, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ; Pharmacotherapy Handbook, Wells 等人, ed., Appleton & Lange, Stamford, CT, 各自以引用方式全文并入本文中)。

[0230] 通常, 病理性病症的治疗通过施用有效量或有效剂量的至少一种抗 MCP-1 抗体组合物来完成, 取决于组合物中包含的比活性, 所述组合物总计为平均至少约 0.01 至 500 毫克至少一种抗 MCP-1 抗体 / 千克患者 / 剂, 并且优选至少约 0.1 至 100 毫克抗体 / 千克患

者 / 单次或多次施用。或者,有效血清浓度可包括 0.1–5000 $\mu\text{g/ml}$ 血清浓度 / 单次或多次施用。合适的剂量是医学从业者已知的,当然将取决于具体疾病状态、待施用组合物的比活性,以及接受治疗的具体患者。在某些情况下,为了达到所需治疗量,可能必须提供重复施用,即重复的单独施用特定监控或计量剂量,其中单独施用可以重复直至达到所需日剂量或效果。

[0231] 优选剂量可以任选包括 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 和 / 或 100–500mg/kg/ 施用,或其任何范围、值或分数,或达到下列血清浓度:0.1、0.5、0.9、1.0、1.1、1.2、1.5、1.9、2.0、2.5、2.9、3.0、3.5、3.9、4.0、4.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、20、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14.0、14.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、12、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14、14.5、15、15.5、15.9、16、16.5、16.9、17、17.5、17.9、18、18.5、18.9、19、19.5、19.9、20、20.5、20.9、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、96、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500 和 / 或 5000 $\mu\text{g/ml}$ 血清浓度 / 单次或多次施用,或其任何范围、值或分数。

[0232] 或者,施用剂量可以根据已知因素而变化,所述因素例如为具体试剂的药物动力学特征,及其施用方式和途径;接受者的年龄、健康状况和重量;症状的性质和程度、目前治疗类型、治疗频率和所需效果。通常活性成分的剂量可以是约 0.1 至 100 毫克 / 千克体重。通常 0.1 至 50,并且优选 0.1 至 10 毫克 / 千克 / 施用或缓释形式对于达到所需效果而言是有效的。

[0233] 作为非限制性实例,人或动物的治疗可以在第 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 或 40 天中的至少一天,或作为另外一种选择或除此之外,在第 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51 或 52 周中的至少一周,或作为另外一种选择或除此之外,在第 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 年中的至少一年,或其任何组合,采用单次、输注或重复剂量,作为 0.1 至 100mg/kg 的一次或定期剂量的至少一种本发明抗体提供,例如 0.5、0.9、1.0、1.1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90 或 100mg/kg/ 天。

[0234] 适合于内部施用的剂型(组合物),每单位或容器一般包含约 0.001 毫克至约 500 毫克活性成分。在这些药物组合物中,基于组合物总重量,活性成分一般将以约 0.5 至 99.999 重量%的量存在。

[0235] 对于肠胃外施用,抗体可以配制成溶液剂、混悬剂、乳剂、颗粒剂、粉末剂或冷干粉剂,它们与可药用肠胃外载体联合或分开提供。此类载体的例子是水、盐水、林格溶

液、葡萄糖溶液和 1-10% 的人血清清蛋白。也可以使用脂质体和非水性载体,例如固定化油。载体或冷干粉末可包含维持等渗性(例如氯化钠、甘露糖醇)和化学稳定性(例如缓冲剂和防腐剂)的添加剂。制剂可以通过已知或合适技术进行灭菌。合适的药学载体在 Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol 的最近版本(其是这个领域的标准参考文本)中有所描述。

[0236] 可替代的施用方式。可以根据本发明使用许多已知的和开发的施用方式用于施用药学有效量的至少一种根据本发明的抗 MCP-1 抗体。尽管在下文说明书中使用的是肺施用,但其他施用方式也可以根据本发明使用,具有合适的结果。本发明的 MCP-1 抗体可以使用适用于经由本文所述或本领域已知吸入方式或其他方式施用的多种装置和方法中的任何一种,在载体中作为溶液剂、乳剂、胶体或混悬剂递送或作为干粉剂递送。

[0237] 肠胃外制剂和施用。用于肠胃外施用的制剂可包含作为普通赋形剂的无菌水或盐水、聚亚烷基二醇例如聚乙二醇、植物来源的油、氢化萘等。用于注射的水性或油性混悬剂可以通过使用合适的乳化剂或湿润剂和助悬剂来根据已知方法制备。用于注射的试剂可以是无毒的、非经口施用的稀释剂,例如溶于溶剂的水溶液剂或无菌注射液或混悬剂。作为可用的载体或溶剂,水、林格溶液、等渗盐水等是允许的;作为普通溶剂或助悬溶剂,可以使用无菌不挥发性油。为了这些目的,可以使用任何种类的不挥发性油和脂肪酸,包括天然或合成或半合成脂肪油或脂肪酸;天然或合成或半合成甘油单酯或甘油二酯或甘油三酯。肠胃外施用是本领域已知的,并且包括(但不限于)本领域熟知的常规注射方法、气压无针注射装置或激光穿孔装置(例如但不限于美国专利 No. 5,851,198 和美国专利 No. 5,839,446 中所公开的材料和方法,所述专利以引用方式全文并入本文中)。

[0238] 可替代的递送方式。本发明还涉及通过下列方式施用至少一种抗 MCP-1 抗体:肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、病灶内、快速灌注、阴道、直肠、口腔、舌下、鼻内或经皮方式。至少一种抗 MCP-1 抗体组合物可以制备用于肠胃外(皮下、肌内或静脉内)或任何其他施用,特别是液体溶液剂或混悬剂形式;用于阴道或直肠施用,特别是半固体形式,例如但不限于乳膏和栓剂;用于口腔或舌下施用,例如但不限于片剂或胶囊的形式;或鼻内施用,例如但不限于粉末剂、鼻滴剂或气溶胶或某些试剂的形式;或经皮施用,例如但不限于,凝胶剂、软膏、洗剂、混悬剂或贴剂递送系统,其含有化学增强剂例如二甲基亚砜以修饰皮肤结构或增加经皮贴剂中的药物浓度(Junginger 等人, In "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S. (编辑), 第 59-90 页, Marcel Dekker, Inc. New York 1994, 以引用方式全文并入本文中),或含有氧化剂,其使得包含蛋白质和肽的制剂能够应用于皮肤上(WO 98/53847),或应用电场以产生瞬间转运途径,例如电穿孔,或增加带电药物通过皮肤的运动性,例如离子电渗疗法,或应用超声,例如透皮吸收超声波(美国专利 No. 4,309,989 和 No. 4,767,402)(上述出版物和专利以引用方式全文并入本文中)。

[0239] 肺/鼻施用。对于肺施用,优选至少一种抗 MCP-1 抗体组合物以可有效达到肺或窦的下部气道的颗粒大小递送。根据本发明,至少一种抗 MCP-1 抗体可以通过本领域已知用于通过吸入施用治疗剂的多种吸入装置或鼻装置中的任何一种递送。能够在患

者的鼻腔或肺泡中沉积气溶胶化制剂的这些装置包括定量吸入器、雾化器、干粉产生器、喷雾器等。适用于指引抗体的肺或鼻施用的其他装置也是本领域已知的。所有此类装置都可以使用适合于以气溶胶形式分配抗体进行施用的制剂。此类气溶胶可包含溶液（水性或非水性）或固体颗粒。定量吸入器如**Ventolin[®]**定量吸入器通常利用推进气体并且要求在吸气期间启动（参见，例如，WO 94/16970，WO 98/35888）。干粉吸入器如**Turbuhaler[™]**（Astra）、**Rotahaler[®]**（Glaxo）、**Diskus[®]**（Glaxo）、**Spiros[™]**吸入器（Dura）、由 Inhale Therapeutics 销售的装置，以及**Spinhaler[®]**粉末吸入器（Fisons）是使用混合粉末的呼吸启动（US4668218 Astra、EP 237507 Astra、WO 97/25086 Glaxo、WO 94/08552Dura、US 5458135 Inhale、WO 94/06498 Fisons，所述专利以引用方式全文并入本文中）。雾化器如**AERx[™]** Aradigm、**Ultravent[®]**雾化器（Mallinckrodt）和**Acorn II[®]**雾化器（Marquest Medical Products）（US5404871 Aradigm，WO 97/22376）（上述参考文献以引用方式全文并入本文中）是由溶液产生气溶胶，而定量吸入器、干粉吸入器等是产生小颗粒的气溶胶。这些市售的吸入装置的具体例子旨在代表适用于本发明实践的具体装置，并且无意于限制本发明的范围。优选地，包含至少一种抗 MCP-1 抗体的组合物由干粉吸入器或喷雾器递送。对于施用本发明的至少一种抗体，吸入装置需具有若干期望特性。例如，经由吸入装置递送有利地是可靠的、可再现的和准确的。为了良好的可呼吸性，吸入装置可以任选递送小的干燥颗粒，例如小于约 10 μm ，优选约 1-5 μm 。

[0240] 实例 1：作为非限制性实例使用噬菌体展示产生对 MCP-1 具有特异性的 MCP-1 抗体

[0241] 申请人此前已显示了鼠抗人 MCP-1 抗体的理想治疗特性，所述抗体被命名为 C775 并且在申请人共同未决的专利申请美国系列 No. 11/170453（那个申请关于重链和轻链可变区分别为 SEQ ID NO：7 和 8）和相关文件中有描述。本次努力的目标是从 HuCAL **GOLD[®]** 中鉴定出至少一种人抗体，所述抗体中和人趋化因子 MCP-1 的生物学活性并且显示具有相似属性。C775 抗体，以及因此所需的人抗 MCP-1 抗体的属性由下文概述的成功标准限定。

[0242] 至少一种治疗抗体的成功标准：

[0243] 以固相形式与人 MCP-1 结合；

[0244] 特异性限定为在 100nM 时缺乏与同源蛋白质人 MCP-2、MCP-3、MCP-4 以及人嗜酸细胞活化趋化因子 1、2 和 3 的结合；

[0245] 抑制人 MCP-1 与其在 Thp-1 细胞上的人受体 CCR2 的结合，且 IC50 值小于参考 Fab C775；

[0246] 抑制人 MCP-1 介导的 THP-1 细胞的趋化性，且 IC50 值小于参考 Fab C775；

[0247] 在次级生物测定（例如 Ca^{2+} 动员或 CCL-2 诱导的受体内化）中抑制人 MCP-1 介导的活性，作为定性的是 / 非标准，或在定量测定中具有与参考 Fab C775 可比较的效力；

[0248] 与人 MCP-1 结合的 $K_d < 0.5\text{nM}$ ；

[0249] 与短尾猴 MCP-1 结合的 $K_D < 20\text{nM}$ ，且优选 $< 10\text{nM}$ ；

[0250] 以可比较的效力抑制天然人 MCP-1 和化学合成的人 MCP-1 的生物活性；

[0251] 在 Fab 再工程改造成 IgG 后，并且在将 C775 的全长 IgG 形式作为比较物的基础上保留标准 1-8。

[0252] 选择过程概述

[0253] 使用 HuCAL GOLD[®]进行 10 次不同的淘选,且筛选出 17856 个克隆,从而产生 1104 个初步命中物。最后在 ELISA 中鉴定出结合合成的人 MCP-1 的 26 个独特 Fab。在那些 Fab 中,根据亲和力、生物活性、特异性以及与短尾猴和天然人 MCP-1 的结合选择 7 个不同的 Fab 用于亲和力成熟。亲本 Fab 的亲和力的范围是 10 至 400nM,并且在放射性配体结合测定中的 IC₅₀ 值为 10 至 600nM。

[0254] 材料和方法

[0255] DNA 限制和修饰酶以及聚合酶购自 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA)、New England Biolabs(Beverly, MA, USA)、Roche Diagnostics(Mannheim, Germany) 和 MBI Fermentas(Vilnius, Lithuania)。特异性 POD 缀合的山羊抗人 IgG F(ab')₂ 片段由 Jacksons(West Grove, PN, USA) 提供,绵羊抗人 IgG、Fd 片段特异性抗体由 The Binding Site(Birmingham, UK) 提供,且与碱性磷酸酶缀合的链霉抗生物素蛋白(ZyMAX[™] 级别)由 Zymed Laboratories(San Francisco, CA, USA) 提供。重组人趋化因子 hMCP-1、hMCP-2、hMCP-3、hMCP-4 以及 hEotaxin 1、hEotaxin 2 和 hEotaxin 3(R&Dsystems) 试剂、配体和抗体:对人 MCP-1 具有特异的 mAb 279(R&Dsystems);合成的 hMCP-1(Bachem);mAb1 小鼠抗 hCCR2 生物素(R&Dsystems);人 γ 球蛋白(Jackson Immuno Research);小鼠 γ 球蛋白(Jackson Immuno Research);mAb mlgG2b 同种型对照生物素(R&Dsystems);链霉抗生物素蛋白-PE(BD Pharmingen);Versene(Invitrogen);PBS(Invitrogen).FCS(PAN);V-底孔板(Greiner);以及 U-底孔板(Nunc)。

[0256] MCP-1 多肽和类似物的制备。如申请人的共同未决的专利申请美国系列 No. 60/682620 和 Kruszynski 等人,2006, J Peptide Sci. 12:25-32 中描述的,分步固相肽合成和亲和纯化以提供分离的、全长的、成熟的(76 个氨基酸)以及正确折叠和任选修饰的人 MCP-1 和变体,其具有生物学活性。设计成显示具有天然表面拓扑学和肽主链结构的变体包括 A40S、V41I 和 F43Y。化学合成也提供了使用 K69 和 K75 处的赖氨酸的 ϵ 氨基用于人 MCP-1 位点特异性生物素化的方法,所述赖氨酸不涉及受体结合或表面活性、在结构中是紊乱的(美国系列 No. 60/682620 和 Kruszynski 等人 2006, JPeptide Sci. 12:354-360)。将 4 个乙烯氧基单位(PEG₄) 的亲水间隔基插入生物素和赖氨酸残基的 ϵ -氨基之间。从生物素酰胺到末端羰基的链长是 19.2 Å。选择间隔基以增加溶解性且提供足够的间隔基长度以用于结合链霉抗生物素蛋白缀合物。MCP-1 和变体的序列在 SEQ ID NO:1 中提供。测定变体保留在 THP-1 细胞中诱导 Ca²⁺ 动员的能力。生物素-Lys⁶⁹ 和生物素-Lys⁷⁵MCP-1 在筛选、固结和亲和力测定中并排进行比较,且没有观察到显著差异。使用 Biacore, 35 个最优化的 Fab 对链霉抗生物素蛋白芯片上固定的 MCP-1 Ile⁴¹、Lys(生物素-PEG₄)⁶⁹ 和 MCP-1 Ile⁴¹、Lys(生物素-PEG₄)⁷⁵ 平行进行分析。一般而言对 MCP-1 K69 和 K75 测量的亲和力是可比较的。

[0257] 噬菌体 Fab 文库。噬菌粒文库基于 HuCAL[®] 概念(Knappik 等人,2000),且使用 CysDisplay[™] 技术用于在噬菌体表面上展示 Fab(Löhning, 2001)。文库编码作为与小外壳蛋白 pI11 的融合物、在 M13 噬菌体上展示的大约 10¹⁰ 个独特的 Fab。对于选择,将 HuCAL GOLD[®] 抗体-噬菌体分成包含不同 VH 主基因的 3 个库。此外在 1 个库(VH1-6)中使用完整文库。对于每次淘选使用 2×10¹³ HuCAL GOLD[®] 输入噬菌体。应用 4 种不同的淘选策

略,包括分别对人 MCP-1 类似物 -1 (V41I, Ile⁴¹) 和类似物 -2 (F43Y, Tyr⁴³) 的 3 轮淘选,以及按照 1-2-1 和 2-1-2 的顺序对类似物的 2 次交替淘选。

[0258] 固相淘选。将 PBS (pH7.4) 中 50 μ g/ml 的 100 μ l 等分试样的人 MCP-1 类似物 -1 (V41I) 或类似物 -2 (F43Y) 直接包被在 **Maxisorp**[®] 孔上 (NalgenNunc, Rochester, NY) 于 4℃ 过夜。将被包被的孔进行洗涤并用 5% MPBS (PBS, 5% 低脂乳粉) 封闭。在室温下在 2 小时内向每孔加入 100 μ l 封闭的 HuCAL **GOLD**[®] 噬菌体。几个洗涤步骤后,将结合的噬菌体用溶于 10mM Tris/HCl (pH8.0) 中的 100 μ l 20mM DTT 进行洗脱,于室温下孵育 10 分钟。将洗脱物用于感染中期大肠杆菌 TG1 (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands), 并将噬菌粒如所述的进行扩增 (Krebs 等人, 2001)。

[0259] 针对人 MCP-1 类似物 -1 (V41I) 和类似物 -2 (F43Y) 的半溶液淘选产生中和 Fab 分子。半溶液淘选通过如下进行:将 2 种生物素化的人 MCP-1 衍生物 V41I, K69-PEG-生物素或 V41I, K75-PEG-生物素 (SEQ ID NO:1) 与 HuCAL **GOLD**[®] 噬菌体在溶液中孵育,随后将噬菌体抗原复合物捕获至 Reacti-BindNeutravidin Coated Polystyrene 微量滴定板条 (PERBIO)。对于淘选,将 1.5ml Eppendorf 管于 4℃ 用由 PBS 0/N 1:1 稀释的 Chemiblocker (Chemicon International) 封闭。次日,将 Reacti-Bind[™]NeutrAvidin[™] (Pierce, Rockford, IL, USA) 微量滴定板条 (结合能力:25 皮摩尔生物素/孔;PERBIO) 用 2×300ml PBS 漂洗,这是减少 neutravidin 结合剂的数目的 2 个预先吸附步骤所需的。向每孔加入在 100 μ l 50% Chemiblocker (Chemicon)、0.05% Tween20 (Sigma) 中的来自 HuCAL **GOLD**[®] 文库的 2×10^{13} 个噬菌体,并于室温下轻微振荡封闭 1 小时。对于第 2 个预先吸附步骤,将噬菌体溶液转移至新的 Reacti-BindNeutravidin Coated Polystyrene 微量滴定板条,并于室温下轻微振荡孵育 1 小时。随后向预先封闭的 1.5ml Eppendorf 管中加入预先吸附的噬菌体和生物素化的抗原 (对于生物素化,生物素与抗原的比率为 3:1;终浓度为 200nM),并于室温下在旋转轮上进行 1 小时的孵育。平行地,将另外的 Reacti-BindNeutravidin Coated Polystyrene 微量滴定板条用 2×300ml PBS 漂洗,用由 PBS 1:1 稀释的 300 μ l Chemiblocker 封闭 1 小时,并用 1×300 μ l PBS 洗涤。将 100 μ l/孔的生物素-抗原-噬菌体复合物用移液管移液到微量滴定板条内,并于室温下轻微振荡孵育 1 小时。几个洗涤步骤后,将结合的噬菌体用溶于 10mM Tris/HCl (pH8.0) 中的 110 μ l 20mM DTT 进行洗脱,于室温下孵育 10 分钟。将洗脱物用于感染中期大肠杆菌 TG1 (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands), 并将噬菌粒如所述的进行扩增 (Krebs 等人, 2001)。

[0260] 所选 Fab 片段的亚克隆和微量表达 (Microexpression)。为了促进可溶性 Fab 的快速表达,将编码所选 HuCAL **GOLD**[®] 噬菌体插入片段的 Fab 经由 XbaI 和 EcoRI 亚克隆到表达载体 **pMORPH**[®]X9_FH 内。Fab 片段携带 C 末端 FLAG[™] 标记 (Prickett 等人, 1989) 和作为第二个 C 末端标记的 6x His 标记 (Chen 等人, 1994)。TG1-F⁻ 转化后,如先前所述进行包含 HuCAL[®]-Fab 片段的周质提取物的单个克隆表达和制备 (Rauchenberger 等人, 2003)。

[0261] 如上所述进行对人 MCP-1 类似物 -1 (V41I) 的固相形式的结合测定法。封闭后加入周质提取物。通过与山羊抗人 IgG, F(ab')₂ 片段特异性抗体孵育来进行 Fab 片段的检测。

[0262] 对固定化的生物素化 hMCP-1 V41I 的筛选使用 Reacti-Bind[™]NeutrAvidin[™]384 孔

板 (Pierce, Rockford, IL, USA) 进行, 所述 384 孔板用在 PBS, pH 7.4 中稀释的 20 μ l 0.5g/l/ml 生物素化的 hMCP-1 类似物 -1 (V41I) 或类似物 -2 (F43Y) 包被, 在 4℃ 下进行 16 小时。在室温下用溶于 TBS, 0.05% Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 中的 1% BSA 封闭 1 小时后, 加入周质提取物。通过与山羊抗人 IgG, F(ab')₂ 片段特异性抗体孵育来进行 Fab 片段的检测。

[0263] 对生物素化 hMCP-1 类似物 -1 (V41I) 的固相筛选通过如下进行: 在 4℃ 下用在 PBS, pH 7.4 中 1 : 1000 稀释的 20 μ l 绵羊抗人 IgG, Fd 片段特异性抗体包被 Maxisorp (Nunc, Rochester, NY, USA) 384 孔板 16 小时。在室温下用溶于 TBS, 0.05% Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 中的 3% BSA 封闭 2 小时后, 加入周质提取物。随后允许捕获的 HuCAL[®]-Fab 片段与溶于 TBS 中的 0.2 μ g/ml 生物素化的 hMCP-1 类似物 -1 (V41I) 结合, 所述结合可通过与缀合至碱性磷酸酶的链霉抗生物素蛋白一起孵育, 随后加入 AttoPhos 荧光底物 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 来进行检测。记录用 430nm 处的激发在 535nm 处的荧光发射。

[0264] 生物活性测定

[0265] 细胞培养。将所有细胞在标准化条件下, 在 37℃ 和 5% CO₂ 下于湿润培养箱中培养。让表达 CCR2 的细胞在标准培养基中生长。另外, 让 THP-1 细胞 (人急性单核细胞性白血病细胞) 在包含 2mM L-谷氨酰胺、1.5g/L 碳酸氢钠、4.5g/L 葡萄糖、10mM HEPES 和 1.0mM 丙酮酸钠, 90%; 10% 胎牛血清 (FBS; Vitacell RPMI 20-2001, ATCC, Manassas, VA) 的 RPMI 中以 4-8 $\times$ 10⁵ 个细胞 /ml 的密度于 37℃ 和 5% CO₂ 下培养。

[0266] 放射性配体结合测定。竞争测定在微孔过滤器板 (Millipore, Bedford, MA) 中进行。将每孔的 1 $\times$ 10⁶ 个 THP-1 细胞与 ¹²⁵I-MCP-1 (1ng/ml; PerkinElmer Life Science, Boston, MA) 连同不同浓度的重组人 (rh)MCP-1 (279-MC, R&D Systems, Minneapolis, MN) 或合成蛋白质一起孵育。将所有试剂都在由 RPMI Medium 1640 (Invitrogen Corp., Grand Island, NY) 和 0.1% BSA 组成的结合缓冲液中稀释。允许竞争在室温下进行 1 小时, 并且将孔用 150 μ l/ 孔的洗涤缓冲液 (结合缓冲液 +1M NaCl) 洗涤 3 次。过滤器上的放射性使用 Wallac Wizard 1470 Automatic Gamma Counter (PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA) 进行计数。计算出可变剂量的重组或合成 MCP-1 对 ¹²⁵I-MCP-1 与 CCR2 结合的抑制百分比。随后将抑制百分比值输入 Graphpad Prism 程序中, 使用 S 形剂量应答曲线用可变斜率以及底部 = 0 和顶端 = 100 的常数进行作图。

[0267] 钙动员测定。按照制造商关于非贴壁细胞的规程使用 FLEXstation[™]Ca²⁺Plus Assay Kit (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 和使用 FLEXstation[™] (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 来以 96 孔的形式进行 Ca²⁺ 动员测定。将 RFU 峰值输入 Graphpad Prism 中用于分析。

[0268] MCP-1 诱导的 CCR2 受体内化 FACS 测定。最优化配体浓度 (合成 MCP-1 的 EC50 100ng/ml) 和孵育时间 (1 小时后大多数内化已发生) 后, 通过加入不同浓度的抗体测定 IC50。将培养的 CCR2 表达细胞用 PBS 洗涤, 并于 37℃ 用 Versene (Invitrogen) 分离约 10 分钟。细胞的所有离心步骤为约 200Xg。将细胞用 FACS 缓冲液 (PBS/3% FCS) 洗涤两次, 计数和检测生存力 (台盼蓝)。将 96V 底孔板 (Greiner) 每孔装满在 100 μ l 中的约 2.5 $\times$ 10⁵ 个细胞并置于冰上。在 96U 底孔板 (Nunc) 中, 将抗体在细胞培养基 (MEME) 中稀

释以使一式三份样品中为约 200 $\mu\text{g/ml}$ 直到 0,001 $\mu\text{g/ml}$ 。在室温下,将不同浓度的抗体与终浓度为 100ng/ml 的合成 MCP-1 (Bachem) 预孵育 10 分钟。将细胞用预孵育的 100 μl MCP-1/ 抗体混合物重悬浮且于 37°C 在培养箱中孵育 1 小时用于受体内化。内化后,将细胞用 180 μl 冷 FACS 缓冲液洗涤 1 次,并且对于所有后续步骤,必须将板维持在冰上以阻止进一步内化。将生物素化的小鼠抗 hCCR2 mAb (R&D Systems) 在 FACS 缓冲液中以 1 : 10 稀释。作为对照,将小鼠 IgG2b 同种型生物素 (Isotype Biotin)mAb (R&D Systems) 同样在 FACS 缓冲液中以 1 : 10 稀释。将终浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 的人和小鼠 γ 球蛋白 (Jackson Immuno Research) 的 1 : 1 混合物加入抗 hCCR2 和对照 mAb 以封闭 Fc- 受体。将细胞在 50 μl 抗 CCR2/ γ 球蛋白混合物 (或对照 IgG2b/ γ 球蛋白混合物) 中重悬浮,且在冰上孵育 1 小时。将细胞用 180 μl FACS 缓冲液洗涤两次,在 50 μl 1 : 400 稀释的链霉抗生物素蛋白-PE (BD Pharmingen) 中重悬浮,并在黑暗中在冰上于 4°C 孵育 1 小时。将细胞用 180 μl FACS 缓冲液洗涤两次,在 100 μl 2% PFA/PBS 中重悬浮,并于 4°C 贮存过夜用于固定 (或者无需 PFA 固定的直接测定也是可能的)。对于 FACS 测量,将细胞用 200 μl FACS 缓冲液重悬浮且各自计数至少 5000 个细胞。

[0269] 亲和力测定

[0270] 关于 K_D 测定的溶液平衡滴定 (SET) 法和使用 BioVeris 的交叉反应性研究。溶液中的亲和力测定基本上如文献 (Friguet 等人,1985) 中所述进行。为了改善 SET 法的灵敏性和精确性,它从经典 ELISA 转移到基于 ECL 的 BioVeris 技术 (Haenel 等人,2005,被接受用于在 Analytical Biochemistry 中出版)。将 1mg/ml 山羊抗人 (Fab)₂ 或山羊抗小鼠 IgG, Fc 片段特异性抗体 (Jackson Immuno Research) 用 BV-tagTM NHS-Ester (Bioveris Europe, Witney, Oxfordshire, UK) 按照制造商的说明书进行标记。该实验在聚丙烯微量滴定板中进行,并且含 0.5% BSA 和 0.02% Tween20 的 PBS pH 7.4 作为测定缓冲液。将未标记的抗原以 4ⁿ 系列进行稀释:对于人和短尾猴 MCP-1,选择 10pM 至 40nM 的浓度范围,且对于交叉反应性对照 (嗜酸细胞活化趋化因子和 MCP-2) 选择 40pM 至 160nM 的浓度范围。不含抗原的孔用于测定 S_{max} 值。加入 100pM Fab 或 IgG (在 75 μL 终体积中的终浓度) 后,将混合物于室温下孵育 2 小时。随后每孔加入用 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 生物素化 MCP-1 (K69) 包被的 25 μl Dynabeads (0.4mg/ml M-280 链霉抗生物素蛋白, DYNAL, Hamburg) 与对于抗人 Fab 终稀度为 1 : 4000 或对于抗小鼠 IgG 终稀度为 1 : 2000 的 BV 标签标记的检测抗体的混合物。在室温下,在 Eppendorf 摇动器 (700rpm) 上孵育 30 分钟后,使用 M-384 **SERIES[®]** Workstation (Bioveris Europe) 检测电化学发光信号。数据使用 Origin 5.0 (Microcal) 软件应用定制的拟合模型进行评估 (对于 Fab : Haenel 等人,2005,被接受用于在 Analytical Biochemistry 中出版;对于 IgG : 根据 Piehler 等人,1997)。

[0271] 对直接包被的抗原的 Biacore K_D 测定。动力学常数 k_{on} 和 k_{off} 使用与共价固定化 MCP-1 结合的系列稀释的各自 Fab、使用 BIAcore 3000 仪器 (Biacore, Uppsala, Sweden) 进行测定。对于共价抗原固定化,使用标准 EDC-NHS 胺偶联化学。动力学测量使用 1.5–500nM 的 Fab 浓度范围,在 PBS (136mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.76mM KH₂PO₄ pH 7.4) 中以 20 $\mu\text{l}/\text{分钟}$ 的流速进行。关于每种浓度的注射时间是 1 分钟,随后为 3 分钟的解离相。对于再生使用 5 μl 10mM HCl。所有传感图谱都使用 BIA 评估软件 3.1 (Biacore) 进行拟合。对生物素-K69 人 MCP-1 和短尾猴 MCP-1 的 Biacore K_D 测定。将生物素-K69 人 MCP-1

和生物素化的短尾猴 MCP-1 包被至链霉抗生物素蛋白芯片表面,并将短尾猴 MCP-1 直接包被至 CM5 芯片。Fab 的结合使用标准方法进行测试。

[0272] 在抗体捕获模式中的 Biacore K_D 测定。在 CM5 芯片(流速为 $5 \mu\text{l}/\text{分钟}$)上用抗 hFab(s. 3. 15) 以 500nM 捕获 Fab,注射每种类似物(MCP1、MCP2、MCP3、MCP4 以及嗜酸细胞活化趋化因子、嗜酸细胞活化趋化因子-2 和嗜酸细胞活化趋化因子-3) 的溶液。所有细胞因子都是无载体的并且以 15 至 500nM 的浓度(对于亲本 Fab 在最优化前)用作分析物用于亲和力测定。传感图谱使用 BIAevaluation 软件进行分析。在抗体捕获模式中对 MCP-1 的 Biacore 亲和力测定对于最优化的结合剂是不可能的,因为达到了 Biacore 的检测极限。

[0273] 对于 Fab 的特异性分析,使用表面等离子体共振(Biacore 3000, Uppsala, Sweden),其中使用捕获测定。Fab 被捕获且各种蛋白质(MCP-2、MCP-3、MCP-4 以及嗜酸细胞活化趋化因子-1、嗜酸细胞活化趋化因子-2 和嗜酸细胞活化趋化因子-3) 被用作分析物。在所有 4 个流动室上,将 CM5 芯片(Biacore, Sweden) 用 6500-8000RU 抗 F(ab)₂(Dianova, AffipureF(ab)₂ 片段山羊抗人 IgG, F(ab)₂ 片段特异性;10mM 乙酸盐缓冲液, pH4. 5) 包被,其中使用标准 EDC-NHS 胺偶联化学。流动室 2-4 用特异性抗 MCP-1Fab(流速为 $10 \mu\text{l}/\text{ml}$ 的 $20 \mu\text{l}$ 500nM Fab,产生 300-400RU 的捕获密度)进行捕获。Fab 捕获后,注射浓度为 100nM 的趋化因子($20 \mu\text{l}$,流速为 $20 \mu\text{l}/\text{分钟}$, PBS pH7. 4)。将趋化因子以小等分试样贮存,并且对于测量只使用具有最多 1 个冻融循环的新解冻的材料。为了避免由 MCP-1 的解离率、Fab 特异性相互作用和抗 Fab/Fab 相互作用引起的解离率的组合,注射缓冲液以测定抗 Fab/Fab 相互作用的解离。将获得的缓冲液传感图谱从特异性传感图谱中减去。使应答单位归一化成捕获在表面上的抗体的量。

[0274] 在抗体捕获模式中与自然 MCP-1 的结合。如上所述使用该方法。将天然 MCP-1 从 PANC1 上清液中纯化并用于结合分析。在 Fab 捕获模式中与自然 MCP-1 的结合良好地在检测极限上,然而,由于提取物中的杂质混淆了天然 MCP-1 的正确浓度,所以真正的亲和力测量是不可能的。

[0275] 向 IgG 的转化

[0276] 为了表达全长 IgG,将重链(VH) 和轻链(VL) 的可变结构域片段从 Fab 表达载体亚克隆到用于人 IgG1、人 IgG4、嵌合人/小鼠 IgG1 和 IgG2a 的合适的 pMorph_hIg 载体中。将限制酶 EcoRI、MfeI、B1pI 用于将 VH 结构域片段亚克隆到 pMorph_hIgG1. 1、pMorph_hIgG4. 1、pMorph_mIgG1. 1 或 pMorph_mIgG2a. 1 中,并且将 EcoRV、BsiWI 用于将 VL 结构域片段分别亚克隆到 pMorph_hIg κ _1、pMorph_hIg λ _1、pMorph_mIg κ _1 或 pMorph_mIg λ _1 载体中。将所得 IgG 构建体在 CNO 表达。

[0277] 结果

[0278] 固相淘选对直接包被至 Maxisorp 板的 hMCP-1(41I) 和 hMCP-1(43Y) 进行。应用各包含 3 轮选择的 4 种不同的淘选策略。亚克隆到表达载体 pMORPHx9_Fab_FH 内后,对直接包被的 hMCP-1(41I) 和生物素化的 hMCP-1 进行固相筛选。在初步筛选中总共分析了 8832 个克隆,且获得了 983 个初步命中物。最后鉴定了 5 个独特的 Fab,但所有 5 个 Fab 在细胞测定中都不中和 MCP-1,从而表明直接包被至 Maxisorp 可能损害了中和表位的构象或至少可接近性。

[0279] 如所述的进行半溶液淘选,将生物素化的人 MCP-1 类似物-1(V41I) 和类似

物 -2 (F43Y) 与 HuCAL GOLD[®]噬菌体在溶液中孵育,随后捕获噬菌体抗原复合物。应用 2 种不同的主要淘选策略,包括分别对生物素化的人 MCP-1 蛋白类似物 -1 (V41I) 和类似物 -2 (F43Y) 的 3 轮淘选 (无交替淘选)。在初步筛选中总共分析了 9024 个克隆并获得了 121 个初步命中物,最终揭示了 18 个独特的结合剂。基于 Luminex 对来自对生物素化的人 MCP-1 蛋白类似物 -1 (V41I) 淘选的 192 个克隆的再筛选导致产生 9 个另外的初步命中物和 3 个另外的独特结合剂,从而显示 Luminex 筛选是捕获筛选的合适的可替代筛选方法。从半溶液淘选中鉴定总共 21 个独特的结合剂,且这些结合剂中的 14 个显示中和活性。来自 HuCAL GOLD[®]的所有中和 Fab 都来源于这次淘选。

[0280] HuCAL GOLD[®] Fab 的表征。将独特的 Fab 表达和纯化以用于进一步表征。通过 BIAcore 测定 hMCP-1 的结合亲和力并将 Fab 在下列测定中表征:1) ¹²⁵I-CCL-2 与 Thp-1 细胞结合的抑制和 2) 在 Thp-1 细胞中 hMCP-2 诱导的 Ca²⁺ 动员的抑制。对在基于细胞的测定中显示出中和活性的 Fab 进行如下方面的进一步测试:1) 与合成短尾猴 hMCP-2 的结合;2) 与用于结合特异性的 hMCP-2 家族相关人趋化因子 (即 MCP-2、MCP-3、MCP-4 以及嗜酸细胞活化趋化因子 1、2、3) 的结合;和 3) 与天然人 hMCP-2 的结合,以确保使用合成 hMCP-2 肽选择的 Fab 识别天然 hMCP-2。选择具有最佳特性的 7 个 Fab 用于另外的亲和力成熟。选择用于亲和力成熟的 Fab 的特性总结于表 2 中。选择用于亲和力成熟的这 7 个 Fab 被分配到 3 个组中用于文库克隆和选择。L-CDR3 和 H-CDR2 最优化平行地进行。轻和重可变链的平行最优化产生了经由交叉克隆组合改善的重链和轻链以产生再进一步改善的抗体的可能性。

[0281] 表 2. 选择用于亲和力成熟的 Fab 候选物的概括。

[0282]

<u>Fab 名</u> <u>称</u>	<u>组别</u>	<u>Kd MCP-1</u> <u>(nM)</u>	<u>放射性配</u> <u>体结合</u> <u>IC₅₀ (nM)</u>	<u>Ca²⁺ 动员</u> <u>IC₅₀</u> <u>(nM)</u>	<u>特异性</u>	<u>Kd 短尾猴</u> <u>[nM]</u>	<u>天然</u> <u>MCP-1</u> <u>结合</u>	<u>序列组</u> <u>Hc Lc</u>
MOR 03336	1	60±33	114	526	MCP-1	170±42	是	VH3/VL-λ 3
MOR 03464	1	75+/-50	105	1340	MCP-1, 2	175±49	是	VH3/VL-λ 3
MOR 03468	1	ND	255	2000	MCP-1	550±14	ND	VH1B/VL-λ 3
MOR 03470	1	46+/-1	645	2100	MCP1	145±92	是	VH1B/VL-λ 3
MOR 03471	2	94+/-6	180	1256	MCP-1	465±106	是	VH1A/VL-κ 3
MOR 03473	2	175+/-20	184	2900	MCP-1	478±95	是	VH1A/VL-κ 3
MOR 03548	3	42	11	124	MCP-1, Eo	54±8	是	VH3/VL-λ 3

[0283]

[0284] 实例 2:来自 Fab 的高亲和力 MCP-1 特异性抗体的评估

[0285] 如所指出的,对游离 Fab 形式的候选物进行用于亲和力成熟的候选物选择。选择标准是:在放射性配体结合测定中的活性、在 Ca^{2+} 动员测定中的活性、通过 Biacore 测量的对人 MCP-1 的亲和力、对人 MCP-1 的特异性、对短尾猴 MCP-1 的亲和力以及在 Biacore 中检测的与天然 MCP-1 的结合。关于亲本 Fab 分组的另外标准是在 ELISA 中的 C775 竞争,并且基于可变重链和轻链的构架家族。将作为 IgG 的成熟候选物的表征,特别是在趋化性测定中,与成熟选择过程平行地进行。

[0286] 将选择用于成熟的 7 个 Fab 分成 3 个不同的序列类型。在第 1 类(组 1,表 2)中, Fab 03336、Fab 03464、Fab 03468 和 Fab 03470 具有 $\text{V}\lambda 3$ 轻链构架与 2 个不同重链构架中的 1 个。Fab 03336 和 Fab 03464 具有 VH3 重链构架,且 Fab 03468 和 Fab 03470 具有 VH1B 重链构架。第 2 类 Fab(组 2,表 2)03471 和 Fab 03473 具有 VH1A 重链构架和 $\text{V}\kappa 3$ 轻链构架。Fab 03548 具有与第 1 类中的两个 Fab 相同的重链和轻链构架(VH3, $\text{V}\lambda 3$),但将其单独维持(组 3,表 2),这是因为它具有特别有效的生物活性和与嗜酸细胞活化趋化因子的结合交叉反应性。关于本文使用的可变区序列分类的完整描述,参见全文以引用方式并入的美国专利 No. 6828422。后面进行成熟的目标是在增加特异性的同时改善 03548 对 CCL-2 的亲和力。

[0287] 成熟前,在 Biacore Fab 捕获模式中只测定出与短尾猴和天然人 MCP-1 的结合而不是亲和力。所有 7 个亲本 Fab 都显示与短尾猴 MCP-1 和天然 MCP-1 结合,这是用于成熟的先决条件。

[0288] 亲本 IgG 的结合特异性。所有 7 个亲本 Fab 转化成 IgG1 后,对 IgG 形式重复交叉反应性研究。嗜酸细胞活化趋化因子 3 与传感器芯片上的葡聚糖表面非特异性结合,并且这种非特异性结合可以通过添加羧甲基葡聚糖竞争失去。因为与其他趋化因子的葡聚糖表面的非特异性结合也是可能的,所以在所有 Biacore 特异性测定中都添加羧甲基葡聚糖。与 Fab 相比而言,IgG 中有两个没有显示与人 MCP-1 的显著结合,有趣的是满足所有成功标准的所有 4 个最终结合剂都来自一个亲本 Fab。

[0289] MCP-1(应答单位)的结合信号通过表面上的捕获抗体的量进行归一化:摩尔结合比率 = (结合抗原的 RU/抗原的分子量) $\times$ (mAb 的分子量 / 捕获在表面上的 mAb 的 RU),并且小于 0.5 的摩尔结合比率预期是不显著的。四个 IgG 显示与 MCP-1 的归一化结合比率 > 0.5 ,并且与所有同源趋化因子的归一化结合比率 < 0.5 ,因此在 IgG 水平上称为特异性的。一个 IgG 也显示出与 MCP-2 和嗜酸细胞活化趋化因子的某些结合,这在 Fab 水平上已得到检测,但这种交叉反应性在 IgG 水平上得到了减少。MOR03468 IgG 的数据未示出。

[0290] $\text{I}^{125}\text{MCP-1}$ 与 THP-1 细胞的结合的抑制(CNT0)。IgG1 形式的亲本结合剂的中和活性首先在放射性配体结合测定中进行测试。通过添加无关人 IgG1 封闭 THP-1 细胞上的 Fc 受体后,MCP-1 结合的抑制对于所有亲本 IgG 而言都是可检测的。四个 IgG 显示抑制放射性标记的人 MCP-1 与 THP-1 细胞的结合,其 IC_{50} 值在参考 IgG C775 的范围内。

[0291] 钙动员的抑制(CNT0)。所有亲本 IgG 都抑制 THP-1 细胞中 MCP-1 诱导的钙动员。四个 IgG 显示与参考 IgG C775 比较在较高的抗体浓度上抑制 MCP-1 诱导的钙动员。

[0292] MCP-1 诱导的趋化性的抑制(CNT0)。因为亲本 Fab 在趋化性测定中无法测试,所

以 MCP-1 诱导的趋化性的抑制以 IgG 形式测试。测试的所有亲本 IgG 在趋化性测定中都是有活性的,且四个 IgG 显示与参考 IgG C775 比较在较高的抗体浓度上抑制 MCP-1 诱导的趋化性。

[0293] 实例 3 :所选 FAB 通过 L-CDR3/H-CDR2 盒平行交换而进行的亲和力成熟亲和力成熟过程的概括

[0294] 在第一轮成熟中,使 L-CDR3 最优化和 H-CDR2 最优化平行地进行。将来自每类 Fab 的 DNA 汇集用于成熟文库构建。将最初的重链 CDR2 和轻链 CDR3 序列用每个 DNA 库的随机化序列置换,产生 6 个新文库:3 个随机化的 H-CDR2 和 3 个随机化的 L-CDR3 文库。这 6 个文库中每个的多样性超过 10^8 个独特的 Fab。将合成的 CCL-241I-生物素-K69 肽用于溶液淘选或被捕获在 neutravidin 包被的塑料孔上的生物素-肽淘选。将 6 个文库各自在各种条件下淘选以富集具有缓慢解离率(即延长的洗涤、减少的抗原浓度)的 Fab。进行 36 次平行淘选,包括溶液淘选和半溶液淘选。减少抗原浓度、选择解离率以及延长洗涤导致产生严格淘选条件。亲和力筛选借助于基于 BioVeris(以前的 IGEN)电化学发光(ELC)的平台进行,允许高通量的亲和力分等和鉴定具有改善亲和力的 Fab 分子。

[0295] 用于亲和力成熟文库。因为对 H1A 和 H1B 的重链 H-CDR2 文库分别进行了克隆,所以克隆了 7 个不同的可变区文库。将两个 H1A 和 H1B 文库随后在选择之前进行汇集,从而产生 6 个选择文库。文库的大小范围是 10^8 至 8×10^9 。除了 MOR03548 λ 3L-CDR3 文库外,所有文库覆盖了所有理论多样性,在所述 MOR03548 λ 3L-CDR3 文库中只覆盖了 0.625x 的理论多样性。文库的质量控制通过随机挑选的克隆的测序来进行。75 个序列中有 71 个(95%)是正确和多样的,而 75 个序列中的 4 个被检测出移码。所有亲本 Fab 的衍生物都可在其各自的文库中找到。

[0296] 为了增加所选抗体片段的亲和力和生物学活性,将 L-CDR3 和 H-CDR2 区通过盒诱变使用三核苷酸指导的诱变来进行平行最优化(Virnektis 等人,1994),而构架区保持恒定。在克隆用于亲和力成熟之前,所有亲本 Fab 片段都经由 XbaI/EcoRI 从相应的表达载体(pMORPH[®] X9_FH)转移到 CysDisplay[™] 载体 pMORPH[®] 25_LHC 内。pMORPH[®] 25_LHC 由 HuCAL GOLD[®] 展示载体 pMORPH[®] 23_LHC 通过去除干扰文库克隆进行 H-CDR2 最优化的一个 BssHII 位点来制备。对于亲本 Fab 片段库的 L-CDR3 最优化,通过 BpiI/SphI 去除结合剂库的轻链的 L-CDR3、构架 4 和恒定区(405bp),并用多样化的 L-CDR3s 谱连同构架 4 和恒定结构域进行置换。这种 L-CDR3 盒的设计、合成和克隆将在其他地方描述(制备原稿)。将 5 μ g 结合剂库载体与 3 倍摩尔过量的携带多样化 L-CDR3s 的插入片段连接。在第二个文库组中, H-CDR2(XhoI/BssHII)是多样化的,而连接构架区保持恒定。为了监控克隆效率,在多样化的 H-CDR2 盒克隆进去之前,将亲本 H-CDR2 用虚设物置换。将 7 个不同文库的连接混合物在 4ml 大肠杆菌 TOP10F 细胞(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)中进行电穿孔,从而产生 1×10^8 至 8×10^9 个独立克隆。这个文库大小确保了理论多样性的覆盖度。如先前所述(Rauchenberger 等人,2003)进行文库扩增。对于质量控制,随机挑选单个克隆并进行测序(SequiServe, Vaterstetten, Germany)。

[0297] 针对人生物素-K69MCP-1(V41I)的半溶液淘选用于亲和力成熟。将从最优化文库中拯救出的 1×10^{13} 个噬菌体在 Reacti-Bind NeutravidinCoated Polystyrene 微量滴定板条上预先吸附两次,随后用 ChemiBLOCKER(Chemicon, Temecula, CA, USA)封闭。将预先吸

附的噬菌体和不同浓度的生物素 -K69 MCP-1 (0.02-50nM) 在溶液中于 22℃ 孵育 1.5 小时, 然后将噬菌体-抗原复合物捕获至 Reacti-Bind Neutravidin Coated Polystyrene 微量滴定板条 (PERBIO)。将 22℃ 下的洗涤步骤延长至最多 12 小时。如上所述进行用溶于 10mM Tris/HCl, pH 8.0 的 20mM DTT 进行的洗脱, 以及每轮淘选之间的噬菌粒扩增。

[0298] 针对人生物素 -K69MCP-1 (V41I) 的半溶液淘选用于亲和力成熟。如上所述将从亲和力成熟文库中拯救出的 1×10^{13} 个噬菌体用 ChemiBLOCKER (Chemicon, Temecula, CA, USA)、0.05% Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 封闭, 并在经由不含 Tween 20 的 ChemiBLOCKER 封闭的 **Dynabeads[®]M-280 Streptavidin** (DynaL Biotech, Oslo, Norway) 上预先吸附两次。在三轮淘选期间进行减少抗原处理, 且生物素 -K69 MCP-1 的浓度为 0.01 至最高 5nM。将封闭的 **Dynabeads[®]** 和磁性颗粒分离器 MPC-E (DynaL Biotech, Oslo, Norway) 用于捕获与生物素化抗原结合的噬菌体。如上所述进行洗涤步骤 (Rauchenberger 等人, 2003)、用溶于 10mM Tris/HCl, pH 8.0 的 20mM DTT 进行的洗脱, 以及每轮淘选之间的噬菌粒扩增。此外可通过选择解离率 (Hawkins 等人, 1992) 和通过延长洗涤步骤 (最高达 6 小时) 来进一步增加淘选严格性。

[0299] 筛选出 3312 个克隆, 且鉴定了来自 7 个亲本 Fab 中的 4 个的 85 个最优化 Fab。鉴定在 L-CDR3 和 H-CDR2 两者中都最优化的 Fab, 并对 2 个不同亲本克隆的衍生物进行改良轻链和重链的交叉克隆, 从而导致产生亲和力 (K_D) 最高达 100 倍的进一步改善。将 K_D 估计为 1-10nM 的最高级别的结合剂 (约 100) 进行测序, 从而导致鉴定了 41 个独特的改善的 Fab。大多数改善的结合剂来源于组 III (03548)。在组 I 和组 II 中进行另外的筛选以在这些成熟组中鉴定出更多改善的 Fab。鉴定了 29 个另外的 I 类和 II 类结合剂。总之, 在成熟过程中鉴定了来源于 7 个亲本 Fab 中的 5 个的 87 个独特的 Fab。表 3 概括了成熟淘选结果。

[0300] 表 3. 选择改善了与 MCP-1 的结合的 Fab 的概括。

[0301]

组别	亲本克隆	改善了 L-CDR3	改善了 H-CDR2	
1	03336	-	14	
1	03470	-	2	
1	03464	-	1	
1	03468	-	-	
2	03471	23	1	
2	03473	-	-	
3	03548	11	35	
总的改善了的 Fab		34	63	87

[0302] 成熟 Fab 中的氨基酸变化位于亲本克隆 03741 和 03548 的 H-CDR2 或 L-CDR3 中。随后进行 Fab 最佳改善的重链 CDR2 与最佳轻链 CDR3 的交叉克隆, 以设法产生具有甚至更高亲和力的 Fab。产生了大约 36 个交叉克隆。同样筛选所有独特 Fab 序列的预测 N 连接的糖基化位点。鉴定了对于重链 CDR2 中的糖基化具有 NIS 共有序列的少数 Fab。将这些 Fab 从进一步表征中排除。总共 84 个 Fab 在 Morplmsys 被表达和纯化, 且被转移至 Centocor 用于生物学表征。

[0303] 用最优化 Fab 时达到了用 Biacore 进行亲和力测量的灵敏性极限。因此通过基于 ECL 的溶液平衡滴定 (SET) (Haenel 等人, 2004, 被提交用于在 Analytical Biochemistry 中出版) 测定亲和力值。亲和力成熟后, 达到约 10pM 的 K_D , 用 KinexA 证实该值。在放射性配体测定中 Fab 结合达到 110pM 的 IC_{50} 。因此, 与亲本 Fab 比较, MCP-1 亲和力和结合动力学两者都改善了高达 1000 倍。四个最优化 Fab 满足所有 9 个成功标准。两个是 L-CDR3 最优化的 Fab, 两个是由 L-CDR3 和 H-CDR2 最优化链组成的交叉克隆。所有 4 个都转化成 IgG1, 并在所有测试测定中都保留了活性, 在放射性配体结合测定中最佳 K_D 为 10pM 而最佳 IC_{50} 为 20pM。一个另外的交叉克隆 MOR03899 作为 IgG1 时满足所有成功标准, 但作为 Fab 时则未能满足所有成功标准。满足成功标准的所有结合剂都来源于 MOR03471 亲本 Fab (SEQ ID No. 2、SEQ ID No. 4)。将独特的 Fab MOR03790 选择用于 IgG 生产、按比例扩大的制备开发和基于 MOR03471 在动物模型中的体内评估, 并且包括表 4D 中给出的重链和轻链可变区序列以及 SEQ ID No. 6、SEQ ID No. 7、SEQ ID No. 9、SEQ ID No. 13、SEQ ID No. 14 和 SEQ ID No. 16。

[0304] 在亲和力成熟期间的 BioVeris 筛选。亲和力改善的 Fab 克隆可通过基于 ECL 的高通量亲和力筛选 BioVeris 测定进行鉴定。命中后, 选择 4 个亚克隆通过相同方法进行巩固。

[0305] 关于亲和力成熟的淘选策略。总共进行 36 次不同的淘选。18 次溶液淘选是针对生物素 -K69 MCP-1 (V41I), 其中噬菌体 - 抗原复合物被捕获至链霉抗生物素蛋白珠。选择过程中的严格性可通过减少抗原浓度、选择解离率和延长洗涤来增加。此外, 进行针对生物素 -K69 MCP-1 的 18 次半溶液淘选, 使噬菌体 - 抗原复合物捕获至 Neutravidin 板。在这些淘选中, 严格性可通过减少抗原和延长洗涤来增加。

[0306] 关于亲和力成熟的 BioVeris 筛选。抗原生物素 -K69 MCP-1 41I 被用于成熟淘选, 并且同样被用于基于 BioVeris 的筛选。筛选可非常有效地用于鉴定改善的结合剂。对于 36 种淘选条件中的每一种, 筛选 92 个克隆, 从而导致产生 3312 个筛选的克隆。总共鉴定了 85 个不同的独特的最优化结合剂。发现了来自所有 3 个组的最优化 Fab。此外, 可以鉴定在 L-CDR3 和 H-CDR2 中最优化的 Fab, 从而使得命名为 MOR03471 和 MOR03548 的 Fab 衍生物能够交叉克隆。46 个最优化的 Fab 来源于 MOR03548, 与 11 个 L-CDR3 最优化的 Fab 比较, 来自 H-CDR2 最优化的 35 个 Fab 显示具有更高的亲和力和活性。而且亲本 MOR03471 在这种成熟中也得到了非常成功地最优化, 具有在 L-CDR3 中最优化的 23 个 Fab 和在 H-CDR2 中最优化的一个 Fab。改善的 Fab 来源于 7 个亲本 Fab 中的 4 个, 表明每个亲本结合剂都具有不同的被最优化潜力。满足所有成功标准的最后 4 个 Fab 来源于 MOR03471, 两个只在 L-CDR3 中最优化, 来自交叉克隆的两个在 L-CDR3 和 H-CDR2 中最优化。

[0307] 最优化 Fab 分子的交叉克隆。HuCAL[®]技术的模块结构允许简单地通过在克隆步骤中组合两条最优化链来快速交叉克隆来源于相同亲本克隆的最优化 Fab 的最优化轻链和重链。交叉克隆是可能获得进一步改善的抗体的快速方法, 无需另外的成熟循环。在一个方面, 将 2 个 L-CDR3 最优化的 MOR03548 衍生物与 6 个 H-CDR2 最优化的 MOR03548 进行交叉克隆, 从而导致产生 12 个交叉克隆。另一方面, 将 22 个 L-CDR3 最优化的 MOR03471 与一个可用的 H-CDR2 最优化的 MOR03471 克隆进行交叉克隆。在这个计划中, 交叉克隆是成功的, 导致产生两个不同的 MOR03471 衍生的交叉克隆 MOR03850 和 MOR03878, 它们最终符合

所有成功标准。

[0308] 16 个预先选择的抗体的详细表征

[0309] 从亲和力筛选中鉴定的 85 个最优化 Fab 和另外 34 个交叉克隆（参见上文）产生了总共 119 个不同的独特最优化 Fab，所述独特最优化 Fab 没有全部通过所有可用测定进行表征。因此，根据 Fab 在放射性配体结合抑制中的 IC_{50} 、在钙释放测定中的活性、在 CDR 中缺乏 N 糖基化位点（表 4A 和表 4B）以及亲和力来预先选择 16 个最优化 Fab。进一步的详细表征包括特异性测试、与天然 MCP-1 的结合和中和、对人和短尾猴 MCP-1 的亲和力、在趋化性测定中的活性以及所有转化的 IgG1 的表征。

[0310] 代表最优化 Fab 的克隆由表 4A-C 中给出的序列表示，其中克隆 MOR03471 亲本 Fab 具有 $VH3 \times \kappa 3$ 构架而 MOR03548 具有 $VH1A \times \lambda 3$ 构架。具有所需物理化学属性（在 CDR 中没有 N 糖基化位点）以及亲和力和生物活性的最优化特性的 17 个所选 Fab 显示在使用的构架（VH3 和 VH1A）内，在 HC-CDR2 和 LC CDR3 序列中具有某些交替的独特 CDR 序列和代表性共有序列，以及更一般地在所有 HC-CDR1 中的共有序列。这些共有序列显示于表 4C-4E 以及 SEQ IN No :2-26 中。

[0311] 表 4A :17 个所选结合剂的重链 CDR 序列

[0312]

亲本	MOR#	VH 类型	HCDR1	HCDR2	HCDR3
MOR03471 衍生物 (L-CDR3)	3781	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGGIIPFGTANYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 衍生物 (L-CDR3)	3790	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGGIIPFGTANYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 衍生物 (L-CDR3)	3791	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGGIIPFGTANYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 $\times$ 克隆 (3822 $\times$ 3797)	3849	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 $\times$ 克隆 (3822 $\times$ 3819)	3850	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 $\times$ 克隆 (3822 $\times$ 3794)	3878	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 $\times$ 克隆 (3822 $\times$ 3788)	3885	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03471 $\times$ 克隆 (3822 $\times$ 3876)	3899	VH1A	GGTFSSYGIS	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG	YDGIYGELDF
MOR03548 衍生物 (L-CDR3)	3744	VH3	GFTFRSYGMS	WVSNIIRDGSYTYADSVKG	FEFTPWTYFDF

亲本	MOR#	VH 类型	HCDR1	HCDR2	HCDR3
MOR03548 衍生物 (L-CDR3)	3747	VH3	GFTRSYGMS	WVSNIRSDGSYTYADSVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3753	VH3	GFTRSYGMS	WVSSIEHKWSGYTTSYAASVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3754	VH3	GFTRSYGMS	WVSSIEHKWSGYATTYAASVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3755	VH3	GFTRSYGMS	WVSSIEHKWSGYATGYAASVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3757	VH3	GFTRSYGMS	WVSSIEHKWTNYATSYAASVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3758	VH3	GFTRSYGMS	WVSSIEHKWTGYATSYAASVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3832	VH3	GFTRSYGMS	WVSSIEHKWSNYATSYAAGVKG	FEFTPWTYFDF
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3836	VH3	GFTRSYGMS	WVSSIEHKWSGYATGYAASVKG	FEFTPWTYFDF

[0313] 表 4B :17 个所选结合剂的轻链 CDR 序列

[0314]

亲本	MOR#	VL 类型	LCDR1	LCDR2	LCDR3
MOR03471 衍生物 (L-CDR3)	3781	VL-κ 3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	HQYIELWSF
MOR03471 衍生物 (L-CDR3)	3790	VL-κ 3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	HQYIQLHSF
MOR03471 衍生物 (L-CDR3)	3791	VL-κ 3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYIDISPM
MOR03471 × 克隆 (3822 × 3797)	3849	VL-κ 3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYISHPQ
MOR03471 × 克隆 (3822 × 3819)	3850	VL-κ 3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYITYPPF
MOR03471 × 克隆 (3822 × 3794)	3878	VL-κ 3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYISFPA
MOR03471 × 克隆 (3822 × 3788)	3885	VL-κ 3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	QQYISQPV
MOR03471 × 克隆 (3822 × 3876)	3899	VL-κ 3	RASQSVSDAYLA	LLIYDASSRAT	HQYIFYPN
MOR03548 衍生物 (L-CDR3)	3744	VL-λ 3	SGDNLGKKYVY	LVITYDDNRPS	QTYDRFSSTA

<u>亲本</u>	<u>MOR#</u>	<u>VL</u> 类型	<u>LCDR1</u>	<u>LCDR2</u>	<u>LCDR3</u>
MOR03548 衍生物 (L-CDR3)	3747	VL-λ 3	SGDNLGKKYVY	LVITYDDDDNRPS	QSYDRFSSTG
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3753	VL-λ 3	SGDNLGKKYVY	LVITYDDDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3754	VL-λ 3	SGDNLGKKYVY	LVITYDDDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3755	VL-λ 3	SGDNLGKKYVY	LVITYDDDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3757	VL-λ 3	SGDNLGKKYVY	LVITYDDDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3758	VL-λ 3	SGDNLGKKYVY	LVITYDDDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3832	VL-λ 3	SGDNLGKKYVY	LVITYDDDDNRPS	QSYTAQSSAS
MOR03548 衍生物 (H-CDR2)	3836	VL-λ 3	SGDNLGKKYVY	LVITYDDDDNRPS	QSYTAQSSAS

[0315] 表 4C. 抗-MCP-1 V-区的共有序列

[0316]

<u>SEQ ID NO.:</u>	<u>wV- 区</u>	<u>FR1</u>	<u>CDR1</u>	<u>FR2</u>	<u>CDR2</u>	<u>FR3</u>	<u>CDR3</u>	<u>FR4</u>
2	VH1A	QVELVQSGAE VKKPGSSVKV SCKAS	<u>GGTFSS</u> <u>YGIS</u>	WVRQAP GQGLE	<u>WMGXIXP</u> <u>XXG</u> <u>XXXYAQK</u> <u>FQG</u>	RVTITADEST STAYMELSSL RSEDNAVYYC AR	<u>YDGI</u> <u>YGEL</u> <u>DF</u>	WGQGTL VTVSS
3	VH3	QVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAAS	<u>GFTFRS</u> <u>YGMS</u>	WVRQAP GKGLE	<u>WVSNIRS</u> <u>DGS</u> <u>YTTYADS</u> <u>VKG</u>	RFTISRDNK NTLYLQMNSL RAEDNAVYYC AR	<u>FEFT</u> <u>PWTY</u> <u>FDF</u>	WGQGTL VTVSS
4	κ 3	DIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSC	<u>RASQSV</u> <u>SDAYLA</u>	WYQQKP GQAPR	<u>LLIYDAS</u> <u>SRAT</u>	GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YC	<u>XQYI</u> <u>XXXX</u>	FTFGQG TKVEIK
5	λ 3	DIELTQPPSV SVAPGQTARI SC	<u>SGDNLG</u> <u>KKYV Y</u>	WYQQKP GQAPV	<u>LVIYDDD</u> <u>NRPS</u>	GIPERFSGSN SGNTATLTIS GTQAED EADY YC	<u>QXYX</u> <u>XXSS</u> <u>XX</u>	FGGGTK LTVL

[0317] 表 4D. 抗 MCP-1 的独特 CDR

[0318]

<u>V- 区</u>	<u>CDR</u>	<u>SEQ ID NO.:</u>	<u>Fab 名称</u>	<u>序列</u>
VH1A	CDR1	6	所有 MOR03471	GGTFSSYGIS
VH1A	CDR2	7	3781、3790、CNT0 888	WMGGIIPIFGTANYAQKFQG
VH1A	CDR2	8	3899	WMGAINPLAGHTHYAQKFQG
VH1A	CDR3	9	所有 MOR03471	YDGIYGELDF
VH3	CDR1	10	所有 MOR03548	GFTFRSYGMS
VH3	CDR2	11	3744、3747	WVSNIRSDGS YTTYADSVKG
VH3	CDR3	12	所有 MOR03548	FEFTPWYFD F

<u>V-区</u>	<u>CDR</u>	<u>SEQ ID NO.:</u>	<u>Fab 名称</u>	<u>序列</u>
κ 3	CDR1	13	所有 MOR03471	RASQSVSDAYLA
κ 3	CDR2	14	所有 MOR03471	LLIYDASSRA T
κ 3	CDR3	15	3781	HQYIELWSF
κ 3	CDR3	16	3790、CNT0888	HQYIQLHSF
κ 3	CDR3	17	3899	HQYIFYPN
λ 3	CDR1	18	所有 MOR03548	SGDNLGKKYV Y
λ 3	CDR2	19	所有 MOR03548	LVIYDDDNRP S
λ 3	CDR3	20	3744	QTYDRFSSTA
λ 3	CDR3	21	3747	QSYDRFSSTG

[0319]

[0320] 表 4E. 抗 MCP-1 CDR 区的共有序列

[0321]

<u>CDR</u>	<u>SEQ ID NO.:</u>	<u>序列</u>	<u>VARIANTS</u>
VH1A-CDR2	22	WMGXIXPXXG XXXYAQKFQG	X4 = A, G X6 = I, N X8 = I, L X9 = A, F X11 = H, T X12 = A, T X13 = H, N
VH3-CDR2	23	WVSSIEHKWX XYXTXYAAXV KG	X10 = S, T X11 = G, N X13 = A, T X15 = G, S, T X19 = G, S

<u>CDR</u>	<u>SEQ ID NO.:</u>	<u>序列</u>	<u>VARIANTS</u>
L κ -CDR3	24	XQYIXXXX	X1 = H, Q X5 = D, E, F, Q, S, T X6 = Q, L, I, H, T, F X7 = W, H, S, P X8 = A, N, Q, V, P- F, P-M, S-F
L λ -CDR3	25	QXYXXXSSXX	X2 = S, T X4 = D, T X5 = A, R X6 = F, Q X9 = A, T X10 = A, G, S
HC-CDR1	26	GXTFXSYGXS	X2 = F, G X5 = S, R X9 = I, M

[0322] 表 5 :所选抗体的亲和力概括

[0323]

<u>K_D[nM]</u>	<u>MOR3757</u>	<u>MOR3781</u>	<u>MOR3790</u>	<u>MOR3850</u>	<u>MOR3878</u>	<u>MOR3899</u>
<u>Fab BioVeris</u> rh MCP-1 n = 2	0.008/ 0.02	0.03 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.32 ± 0.14	0.81 ± 0.18
<u>Fab BioVeris</u> 短尾猴 MCP-1 n = 2	0.01/ 0.07	0.004/ 0.01	0.06 ± 0.02	0.04	0.32 ± 0.04	0.49 ± 0.04
<u>Fab KinexA</u> bt-K69h MCP-1 (CNT0)	0.0067	0.0089	0.075	0.02	ND	ND
<u>IgG1 BioVeris</u> rh MCP-1 n = 2	ND	0.02	0.07 ± 0.03 n = 3	0.011 ± 0.005 n = 3	0.27 ± 0.06	0.34 ± 0.05

<u>K_D[nM]</u>	<u>MOR3757</u>	<u>MOR3781</u>	<u>MOR3790</u>	<u>MOR3850</u>	<u>MOR3878</u>	<u>MOR3899</u>
IgG1 BioVeris 短尾猴 MCP-1 n = 2	ND	0.016 ± 0.008	0.06 ± 0.01 n = 3	0.021 ± 0.015 n = 3	0.23 ± 0.02	0.36 ± 0.06

[0324] 通过 Biacore 测量的与天然 MCP-1 的结合。在 Biacore Fab 捕获模式中测试与天然 MCP-1 的结合,所有选择的 Fab 都显示与天然 MCP-1 结合。尤其是因为对于最优化 Fab 达到了在 Biacore 中关于 K_D 测定的检测极限,所以必须使用用于亲和力测定和特异性证实的可替代方法。

[0325] IgG 转化。将选择用于详细表征的所有最优化 Fab 都转化成 IgG1 形式,另外将 4 个 Fab 亚克隆成 IgG4 形式。测试的人 IgG4 的表达数据和在不同测定中的活性与各自的 IgG1 一样好。

[0326] 使用 Bioveris 的溶液平衡滴定。作为用于灵敏 K_D 测定的可替代方法,进行采用 Bioveris 技术的溶液平衡滴定 (SET)。单价解离常数通过关于 Fab 和 IgG 的合适拟合模型来计算。这种方法适合于亲和力测量和交叉反应性研究。将所有选择的 16 个结合剂都通过采用 BioVeris 的溶液平衡滴定 (SET) 进行分析 (表 5 和表 6),并且将这些亲和力值视为最终亲和力值。若干结合剂 (包括作为 Fab 和 IgG 的 MOR03757、MOR03781、MOR03790、MOR03850、MOR03878 以及作为 IgG 的 MOR03899) 满足针对人 MCP-1 < 0.5nM 和针对短尾猴 MCP-1 < 20nM 的亲和力成功标准。对人 MCP-1 的最佳亲和力在 Fab 水平上为 20 至 40pM,而在 IgG 水平上为 10 至 20pM (表 5)。对短尾猴 MCP-1 的最佳亲和力在 Fab 水平上为 10 至 40pM,而在 IgG 水平上为 20pM (表 6)。

[0327] 使用 Bioveris 的特异性测试。除亲和力之外,还在使用 BioVeris 的溶液平衡滴定 (SET) 中分析特异性,尤其是与嗜酸细胞活化趋化因子和 MCP-2 的交叉反应性。对于所选的 16 个 Fab 和 15 个测试的 IgG (16 个所选 IgG 中有一个是不可用的) 中的任何一个没有检测到与人 MCP-2 的交叉反应性。因为人 MCP-1、人 MCP-2 主要与 CCR2 受体结合,而人嗜酸细胞活化趋化因子占优势地与 CCR3 受体结合。对于 MOR03744、MOR03747、MOR03790 和 MOR03781 Fab 和 IgG,在 BioVeris 中没有检测到与人嗜酸细胞活化趋化因子的交叉反应性,而 12 个所选结合剂 (包括 MOR03850) 以 Fab 或 IgG 形式显示与嗜酸细胞活化趋化因子的某些交叉反应性 (数据未显示)。

[0328] 最优化抗体在 Biacore 抗体结合模式 (CNT0) 中的特异性。对所选 IgG 进行特异性评估。在 Biacore 中,向捕获的最优化抗体中加入 100nM 人 MCP-1、人 MCP-2、MCP-3、MCP-4 以及人嗜酸细胞活化趋化因子 1、人嗜酸细胞活化趋化因子 2 和人嗜酸细胞活化趋化因子 3。MOR03790、MOR03791、MOR03747、MOR03850、MOR03744、MOR03849、MOR03878、MOR03885、MOR03899 和 MOR03781 IgG 未显示与同源物趋化因子的明显结合信号,并且满足特异性成功标准 (表 6)。

[0329] Fab 与 MCP-2 的结合不抑制 ¹²⁵I MCP-2 与 Thp-1 细胞的结合 (CNT0)。为了分析在 Biacore 中检测到的 Fab 与 MCP-2 和嗜酸细胞活化趋化因子的结合活性是否转变成中和活性,在 Centocor 开发了放射性配体全细胞结合测定。¹²⁵I MCP-2 显示与 Thp-1 细胞结合良

好,并且该结合被未标记的 MCP-2 的添加抑制,而不被 MCP-1 特异性的参考抗体 C775 的添加抑制。结果提供了用于测试结合 / 中和和特异性的重要功能测定。在受体结合测定中使用 1ng/ml MCP-1,而在这种测定法中需要约 100ng/ml 的 MCP-2,因为 MCP-2 的标记可能会引起活性的丧失。MOR03754 显示没有显著抑制 125I 标记的 MCP-2 与 Thp-1 细胞上的 CCR2 受体的结合 ($IC_{50} \geq 2 \mu M$)。

[0330] 成熟的 Fab 有效抑制 I^{125} MCP-1 与 THP-1 细胞的结合 (CNT0)。由于需要少量的 1ng/ml 的 MCP-1,这种测定是这个计划中最灵敏的测定,测定的 IC_{50} 极限对于 Fab 为约 100pM,并且对于 IgG 甚至为 20pM(表 5)。最优化后,Fab 必须以低于参考 Fab C775 的 IC_{50} 抑制人 MCP-1 与其在 Thp-1 细胞上的人受体 CCR2 的结合。亲本 MOR03471 Fab 显示具有 180nM 的 IC_{50} ,并且最优化的 MOR03471 Fab 衍生物 (MOR03781 为 180pM,MOR03790 为 260pM、MOR03850 为 160pM、MOR03878 为 110pM 而 MOR03899 为 130pM) 显示在最优化期间高达 1000 倍的活性总体改善。尽管这种测定是这个计划中可用的最灵敏的测定,但即使在这种测定中最优化的结合剂似乎也已达到了测定的极限。

[0331] 成熟的 IgG 有效抑制 I^{125} MCP-1 与 Thp-1 细胞的结合 (CNT0)。通过添加无关的人 IgG1 封闭 Fc 受体结合位点对于放射性配体结合和钙动员测定而言是重要的。所有测试的 IgG1 在放射性配体结合测定中都保留有活性。最优化 MOR03781 的 IC_{50} 值是 20pM,对于 MOR03790 而言为 30pM,对于 MOR03850 而言为 50pM,对于 MOR03878 而言为 30pM,并且对于 MOR03899 而言为 50pM。MCP-1 诱导的 CCR2 受体内化的抑制 FACS 测定开发。受体内化测定使用表达 CCR-2 的细胞进行,所述表达 CCR-2 的细胞显示比 THP-1 细胞更高的 CCR2 的表达,从而导致产生更佳的信噪比。首先,将合成的人 MCP-1 在该测定中进行滴定以确定 EC_{50} 值。发现对于 MCP-1 的 EC_{50} 是 116ng/ml。因此,对于进一步的 FACS 测定,选择 100ng/ml (11nM) MCP-1。此外,在 37°C 下评估获得完全内化的最佳孵育时间。大多数内化在最初 30 分钟内发生。因此在所有后续测定中都使用 1 小时的孵育时间。该测定被成功开发以允许测定 IC_{50} 。测量用于抑制 MCP-1 诱导的受体内化的 0.001 至 200 $\mu g/ml$ 的 Fab 或 IgG 的活性和分等。所选的最优化结合剂显示良好抑制 MCP-1 诱导的受体内化(数据未示出)。将两批不同的 Fab 进行平行测试,显示了可再现性。

[0332] 对于使用 Fab 的内化测定,对于 MOR03790 而言检测到 IC_{50} 为 5nM,对于 MOR03850 而言为 4nM,对于 MOR03781 而言为 7nM,对于 MOR03878 而言为 5.3nM,且对于 MOR03899 而言为 3.3nM(表 6)。MOR03781 IgG1 也显示为 7nM,表明活性在 IgG 转化后被保留。

[0333] 钙动员的抑制 (CNT0)。MCP-1 在 THP-1 细胞中诱导钙动员,这可以借助于荧光团 (fluorophore) 进行检测。最优化的抗体显示有效抑制钙动员,4 个最终候选物 MOR03781、MOR03790、MOR03850 和 MOR03878 Fab 显示 IC_{50} 值为 18 至 28nM。各自的 IgG 再次保留了活性,并且由于每个 IgG 中和 2 个 MCP-1 分子的能力,显示甚至略微更佳的约 6 至 10nM 的 IC_{50} 值。再次在约 10nM 时似乎达到测定的极限。

[0334] 天然 MCP-1 诱导的钙动员的抑制。将天然 MCP-1 从 PANC1 上清液中进行纯化并用于诱导钙释放。与参考抗体 C775 比较,最优化 Fab 显示以更高的活性抑制天然 MCP-1 诱导的钙动员。再次在约 10 至 20nM 天然 MCP-1 时似乎达到了测定的极限。

[0335] 趋化性的抑制。由于潜在的非特异性作用,亲本 Fab 无法在趋化性测定中进行测试,但成熟后所有测试的最优化 Fab 都特异性抑制趋化性,这可能是由于活性增加所致。测

试的所有最优化 IgG 在趋化性测定中都是有活性的。因为测定是半定量的,所以无法测定正确的 IC_{50} 值。

[0336] 与参考抗体 C775 的结合竞争。所有 MOR03548 衍生的预先选择的 Fab 在竞争固相形式中完全抑制 C775 与 MCP1 的结合。所有 7 个 MOR03471 衍生的预先选择的 Fab 在这个测定中显示部分 (60%) 竞争。

[0337] 总结数据

[0338] 表 6 :满足成功标准的 Abs 的概况

[0339]

	<u>参考</u>	<u>MOR3790k</u>	<u>MOR3850k</u>	<u>MOR3781k</u>	<u>MOR3878k</u>	<u>MOR3899k</u>
<u>成功标准</u>	Fab IgG	Fab IgG	Fab IgG	Fab IgG	Fab IgG	Fab IgG
#1,6 MCP-1 Kd < 0.5nM IGEN	65, -	0.12, 0.07	0.04, 0.01	0.03, 0.02	0.32 0.27	(0.81) 0.34
#2 MCP-1 特 异性 BIAcore (IgG)	无, 无	(MCP- 2/Eo), 无	(MCP- 2/Eo), 无	(MCP- 2/Eo), 无	(MCP- 2/Eo), 无	(MCP- 2/Eo), 无
#3 ¹²⁵ I MCP-1 抑制 IC50 < C775	35.6, 25.6	0.26, 0.03	0.16, 0.05	0.18, 0.02	0.11, 0.03	0.13, 0.05
#4 趋化性的 抑制	是, 是	是, ND	是, ND	是, ND	是, ND	是, ND

	<u>参考</u>	<u>MOR3790k</u>	<u>MOR3850k</u>	<u>MOR3781k</u>	<u>MOR3878k</u>	<u>MOR3899k</u>
#5 Ca ²⁺ 动员 的抑制 IC ₅₀ < C775	71.5, 62.3	25.02, 4.26	28.42, 9.47	21.8, 10.9	20.24, 6.7	17.54, 5.85
#7 短尾猴 MCP-1 K _d < 10nM	ND, ND	0.06, 0.06	0.04, 0.01	0.01, 0.02	0.32, 0.23	0.49, 0.36
#8 天然 MCP- 1 诱导的 Ca ²⁺ 的抑 制	是, ND	是, ND	是, ND	是, ND	是, ND	是, ND
延伸的测 量 -1 C775 竞争	是, 是	部分, ND	部分, ND	部分, ND	部分, ND	部分, ND

	<u>参考</u>	<u>MOR3790k</u>	<u>MOR3850k</u>	<u>MOR3781k</u>	<u>MOR3878k</u>	<u>MOR3899k</u>
延伸的测 量 -2 CCR2 内化 的抑制	65, ND	5, ND	4, ND	7, 7	5. 3, ND	3. 3, ND

[0340]

[0341] 实例 4 :治疗候选物的选择

[0342] 最终治疗候选物 CNT0888 的选择和产生。

[0343] 仅在其轻链 CDR3 序列方面不同的两个 mAb 3781 和 3790 (表 4B 和 4D, SEQ ID No : 15 和 16) 在测定中显示出几乎等同的生物学活性。进行计算机 (In silico) 免疫原性分析, 以鉴定潜在的 HLA II 类结合肽且确定候选物在 HLA 结合表位方面是否显著不同。分析预测 mAb 3790 会呈现出比 mAb3781 更低的免疫原性可能性。基于这点以及表 6 中显示的其他生物化学和生物学分析, 将包含重链 VH1A 构架区 (SEQ ID NO. 2) 和重链 CDR 区 SEQ IDNO. 6、7 和 9 ; 以及轻链 K3 构架 (SEQ ID NO :4) 和 CDR 区 SEQ ID NO :13、14 和 16 的 3790 选择作为最终的治疗 mAb。

[0344] 由于在克隆过程中引入的氨基酸变化, mAb 3790 的 N 末端序列包含来自人种系序列的变异。此外, 氨基酸密码子 (即 DNA 序列) 偏向在原核细菌细胞中最大表达。重新合成 MAb DNA 以校正与种系序列的有缺点的 N 末端比对, 并使密码子偏倚改变成在高度表达的人蛋白质中有利的那些。将序列修饰的 3790mAb 命名为 CNT0 888, 其分别包含 SEQ ID NO : 27 和 28 以及下文 (有下划线的是 CDR) 的重链和轻链可变区序列, 其中重链的 N 末端残基是 QVQ (Gln-Val-Gln) 和或轻链的是 EIV (Glu-Ile-Val)。

[0345] CNT0888 重链可变序列 (SEQ ID NO :27) QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYGIS
WVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYDGIYGELDFWQGQ
TLTVVSSCNT0888 轻链可变序列 (SEQ ID NO :28)EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSDAYLAW
YQQKPGQAPRLLIYDASSRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCHQYIQLHSFTFGQGTKVEIK

[0346] CNT0888 的生物化学和生物物理学特征。 CNT0 888 是全长人 IgG1 K 抗体。在该序列中没有预测的 N 连接的糖基化位点。CNT0 888 (在 HEK293 细胞中瞬时表达且通过 A 蛋白亲和层析进行纯化) 的生物化学和生物物理学特性在 SDS-PAGE、大小排阻层析 (SEC)、质谱 (MS) 和 BIAcore 中对于结合亲和力 (Kd) 和特异性进行表征。在 SDS-PAGE 中, 天然 CNT0 888 作为大约 150kDa 处的单一条带迁移。还原的 /alkalvated IgG 作为大约 60kDa 和 33kDa 处的两个条带迁移。CNT0 888 的大小排阻层析证明, IgG 以与对 Remicade IgG 对照测得的洗脱体积相同的洗脱体积 (数据未显示) 作为单个峰洗脱。最后, MS 分析显示 CNT0888 具有 147,000Da 的质量 (数据未显示)。BIAcore 分析证明, CNT0 888 与人和短尾猴 CCL-2 的结合亲和力 (Kd) 分别是 30 和 10pM。CNT0888 在 BIAcore 中没有显示与 CCL-2 相关趋化因子, 即 MCP-2、MCP-3、MCP-4 以及嗜酸细胞活化趋化因子 1、嗜酸细胞活化趋化因子 2 和嗜酸细胞活化趋化因子 3 的可检测结合。

[0347] CNT0888 的体外表征。 在多种基于细胞的测定中评估 CNT0 888 的生物学活性。在所有成功标准测定中评估的瞬时表达的 CNT0 888 具有与亲本 mAb 3790 不能区别的活性 (表 5)。

[0348] 实例 5 :抗 MCP-1 抗体的克隆和表达

[0349] 具有 CNT0 888 质粒 p2844 和 p2882 的等分试样的大肠杆菌分别包含抗体的重链和轻链。质粒 p2844 包含在抗 CD4 重链启动子下的 CNT0888 编码区的最优化重链编码序列, 而质粒 p2882 包含在抗 CD4 轻链启动子下的 CNT0888 编码区的最优化轻链。两个构建体都包括 gpt 选择基因以给予针对 MHX (霉酚酸、次黄嘌呤和黄嘌呤) 的化学抗性。对每个质粒进行纯化、表征、定量和测序。

[0350] 将来自 C463A 宿主细胞系的指数培养的细胞与线性化的 p2844 和 p2882 共电穿

孔,所述 C463A 宿主细胞系是适合在化学成分确知培养基中生长的 Sp2/0 衍生物 (CD- 杂交瘤)。48 小时后,将细胞暴露于 $1 \times \text{MHX}$ (0.5mg/L 霉酚酸、2.5mg/L 次黄嘌呤和 50mg/L 黄嘌呤)。选择后 3 天,细胞生存力已减少至小于 13%,在这时将约 90,000 个活细胞在甲基纤维素中进行铺平板。将细胞不受干扰地培养 8 至 13 天,随后使用 Halo 操作进行筛选并挑取到 24 孔板内。扩大培养且获得 24 孔过度生长滴度。

[0351] 最高的亲本细胞系 (1C4) 具有 70mg/L 的 24 孔过度生长滴度和在摇瓶中 (在 CD- 杂交瘤培养基中) 的 108.5mg/L 的滴度。选择这个亲本细胞系 C1262A 用于在摇瓶中的进一步评估。将 C1262A 提交给细胞库组 (CellBanking Group) 用于产生开发细胞库 (Development Cell Bank) (DCB)。来自 DCB 的命名为 C1262A :DCB ;02SEP04 的细胞对于支原体和无菌性测试为阴性。为了支持进一步的调查研究,从摇瓶 (添加大豆蛋白胨) 中的 C1262A 细胞生产 CNT0 888 达到 230mg/L 的滴度且由 2L 培养物产生 366mg 纯化 CNT0 888。平行地,使 C1262A 细胞的另外 9L 培养物产生 2g 粗 CNT0 888 材料用于早期纯化和制剂开发。

[0352] 将亲本细胞系 C1262A 用 Halo 操作进行亚克隆,获得五个高生产的亚克隆细胞系。最佳亚克隆细胞系 (4D5) 具有 150.5mg/L 的 24 孔过度生长滴度和在摇瓶中 (在 CD- 杂交瘤中) 的 167mg/L 的滴度。将这个亚克隆细胞系编码为 C1262B。

[0353] 实例 6 :用 CNT0888 治疗人胰肿瘤

[0354] 该研究调查肿瘤 MCP-1 (由人肿瘤衍生的细胞产生) 的封闭是否抑制鼠异种移植物中的肿瘤生长。为了测量肿瘤以及宿主 MCP-1 同源物 JE 在恶性疾病的生长和进展中的作用,测试抗人 MCP-1 和抗小鼠 JE 抗体两者在体内抑制人胰肿瘤生长的能力。

[0355] 将具有 BxPC-3 胰肿瘤的小鼠用命名为 CNT0888 的人抗人 MCP-1 抗体进行治疗,所述抗体包含与人 IgG1 恒定区融合的可变区序列 (SEQ ID No :27 和 28)。为了比较 CNT0888 与其中发现最有效抑制宿主作用的先前测试的鼠抗体的体内活性,将 CNT0888 和鼠抗人 MCP-1 (C775) 与抗 muJE (C1142) 组合施用。基于最终的肿瘤重量测量,人 (CNT0888) 和鼠 (C775) 抗人 MCP-1Mab 都显著抑制肿瘤生长。

[0356] 材料和方法

[0357] BxPC-3 是人胰腺癌衍生的细胞。由 Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 肿瘤制备的 Matrigel™ 可购自 Becton Dickinson (0.2EU/mg, Bedford, MA)。

[0358] C775 是小鼠抗人 MCP-1 Mab,而 C1142 是大鼠 / 鼠嵌合抗小鼠 JE 抗体,其具有在申请人共同未决的专利申请美国系列 No. 11/170453 和相关文件中描述的大鼠可变区和小鼠恒定区。对照抗体 cVaM 是由大鼠可变区和小鼠恒定区组成的大鼠 / 鼠嵌合 IgG_{2a}k,它充当 C1142 和 C775 的同种型对照。临床级别的人 IgG 可购自 Beckett Apothecary and Home Health Care, Inc (Sharon Hill, PA),并且充当 CNT0888 的对照。

[0359] 在本研究中使用可购自 Charles River (Raleigh, NC) 的雌性 SCID 小鼠 (6-8 周大)。将小鼠在过滤器居于顶部的塑料笼中分组饲养并供应高压灭菌的食物和水。

[0360] 将 BxPC-3 细胞在包含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基 (完全培养基) 中培养。将细胞在研究开始前四十八小时以 1 : 3 分开。在研究当天,将细胞用胰蛋白酶处理以产生单细胞悬浮液,并将细胞悬浮液用 10 体积的完全培养基洗涤以中和胰蛋白酶。将细胞离心且重悬浮于无血清 RPMI 中。将 Matrigel™ 于 4℃ 过夜解冻。Matrigel™- 肿瘤细胞悬浮液

通过将等体积的 Matrigel™ 溶液和 BxPC-3 细胞混合而制备。癌细胞悬浮液的最终浓度是在 5mg/ml Matrigel™ 中为 5×10^6 个细胞 /ml。

[0361] 在第 0 天,将 80 只雌性 SCID 小鼠皮下 (s. c.) 植入 0.2ml BxPC-3 细胞悬浮液。0.2ml 细胞悬浮液包含 1×10^6 BxPC-3 个细胞和 1.0mgMatrigel™。使用冷注射器以避免 Matrigel™ 聚合。

[0362] 表 7. 抗肿瘤研究设计。

[0363]

组编号	每组中的动物数	治疗 (腹膜内 (i. p.))
1	10	PBS
2	10	cVaM+huIgG (20mg/kg 每种抗体)
3	10	C775+C1142 (20mg/kg 每种抗体)
4	10	CNT0888+C1142 (2mg/kg 每种抗体)
5	10	CNT0888+C1142 (20mg/kg 每种抗体)

[0364] 所有动物在研究开始时和在研究过程中每周一次进行称重。一旦观察到肿瘤生长 (3.0mm^3),就用卡尺在两个维度 (长度和宽度) 上测量肿瘤,单位为毫米 (mm)。监控小鼠的肿瘤生长,并基于式 [长度 $\times$ 宽度 $\times$ 宽度]/2 计算肿瘤体积 (mm^3)。

[0365] 在肿瘤细胞植入后第 14 天,将具有约 50^3 的平均肿瘤体积的小鼠随机分成五组 ($n = 10/\text{组}$)。治疗 (表 7) 在第 14 天开始,并且对于剩余部分的研究 (第 14 天治疗开始后的 52 天) 每周实施两次治疗。对于剩余部分的研究每周测量一次肿瘤。在研究结束时,将小鼠通过 CO_2 窒息实施安死术。将肿瘤解剖、在数字天平上称重和固定。将肿瘤用数码相机进行拍照。在第 50 天,组 3 中的一只小鼠具有超过在研究指导下可接受极限的肿瘤,且被处死。该动物的体积和重量被包括在最终分析中。

[0366] 对于肿瘤重量,数据经由标准线性模型和方差分析 (ANOVA) 进行分析。除非另外指明,否则对于所有检验和比较小于 0.05 的 P 值视为显著的。使用对数尺度,因为更好地满足相等方差和正态分布型的根本假设。将对于没有肿瘤的小鼠的 6 个零值用样条插入值 (0.007240538) 替换,所述样条插入值可促进对数尺度中的统计学分析而不破坏数据结构。

[0367] 对于肿瘤体积,将重复的测量模型对假定一阶自相关协方差结构的数据进行拟合。使用天然样条以灵活模拟时间曲线中的趋势曲率。在每个时间点上进行组内的成对比较。通过 R 软件环境进行计算。

[0368] 结果

[0369] PBS 和 cVaM/huIgG 阴性对照组都显示出相似的肿瘤生长,在 51 天后达到 350mm^3 。

这表明用无关抗体的抗体治疗不抑制肿瘤生长。三个测试组 (C775/C1142 和 CNT0888/C1142) 中的肿瘤生长比阴性对照组中更慢,从而表明抗 CCL2/ 抗 JE 治疗对肿瘤生长有影响。如从第 18 天到研究结束时通过肿瘤体积测量的,与 PBS 对照组比较, C775/C1142 和 CNT0888/C1142 (2mg/kg) 组显示出明显的肿瘤抑制。与 PBS 对照组比较,从第 18 天到第 39 天 CNT0888/C1142 (20mg/kg) 组显示出显著的抑制。

[0370] 在第 51 天研究结束时获取肿瘤重量 (表 8)。在 PBS 组 1 (1 只小鼠)、C775/C1142 组 3 (3 只小鼠) 和 CNT0888/C1142 组 4 (2 只小鼠) 中存在无肿瘤小鼠。当比较肿瘤重量时,与 PBS 对照组比较, CNT0888 测试组各自显示出肿瘤重量的显著减少 (表 8)。以 2mg/kg 给药的 CNT0888/C1142 组的抑制百分比是 80% ($P = 0.006$), 而以 20mg/kg 给药的 CNT0888/C1142 组的抑制百分比是 68% ($P = 0.046$)。C775/C1142 组也显示肿瘤生长的显著抑制 ($P = 0.004$)。在肿瘤体积对肿瘤重量结果的统计学解释中的可见差异最可能是由于与从动物中切除的肿瘤的称重的精密度相比较,用卡尺测量肿瘤体积的不精确所致。

[0371] 表 8. 最终的肿瘤重量

[0372]

动物#	PBS	cVaM+Hu IgG	C775+C1142	CNT0888+C1142*	CNT0888+C1142
1	0	0.142	0	0.089	0.116
2	0.34	0.349	0.075	0	0.13
3	0.368	0.302	0	0.04	0.028
4	0.239	0.667	0.032	0.123	0.13
5	0.386	0.268	0.273	0.198	0.453
6	0.222	0.178	0.018	0.065	0.059
7	0.926	0.531	0.044	0.196	0.058
8	0.484	0.485	0.307	0.128	0.029
9	0.564	0.302	0	0	0.024
10	0.459	0.28	1.328	0.031	0.356
平均数					
肿瘤重量 (g)	0.399	0.350	0.208	0.087	0.138
SD	0.244	0.163	0.410	0.073	0.148

[0373] 总之,这些结果表明在确立的 BxPC-3 模型中, MCP-1 和小鼠 JE 的封闭明显抑制了肿瘤生长,并且 CNT0888 具有抗肿瘤活性。

[0374] 参考文献

[0375] Abraham R., Buxbaum, S. Link, J., Smith, R., Venti, C., Darsley, M. (1996). Determination of Binding Constants of Diabodies directed against Prostate-specific Antigen using Electrochemiluminescence-based Immunoassays. J. Mol. Recognit., 9(5-6):456-61.

[0376] Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K., (1998) Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, New York,

USABelperio JA, Keane MP, Burdick MD, Lynch JP 3rd, Xue YY, Berlin A, Ross DJ, Kunkel SL, Charo IF, Strieter RM. (2001). Critical role for the chemokine MCP-1/CCR2 in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Clin Invest.* 108(4) : 547-56.

[0377] Boder, E. T., Midelfort, K. S., Wittrup, K. D. (2000). Directed evolution of antibody fragments with monovalent femtomolar antigen-binding affinity. *PNAS* 97, 20, 10701-10705

[0378] Carnevale KA, Cathcart MK. (2003). Protein kinase C β is required for human monocyte chemotaxis to MCP-1. *J Biol Chem.* 278(28) : 25317-22.

[0379] Chen Y, Hallenbeck JM, Ruetzler C, Bol D, Thomas K, Berman NE, Vogel SN. (2003). Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in the brain exacerbates ischemic brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23(6) : 748-55.

[0380] Chen, B. P., Hai, T. Expression vectors for affinity purification and radiolabeling of proteins using *Escherichia coli* as host. *Gene* 139, 73-75. 1994 Chen, Y., Wiesmann, C., Fuh, G., Li, B., Christinger, H. W., McKay, P., de Vos, A. M., Lowman, H. B. (1999).

[0381] Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen. *J. Mol. Biol.* 293, 865-881

[0382] Conti P, DiGioacchino M. (2001). MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc.* 22(3) : 133-7.

[0383] Dawson J, Miltz W, Mir AK, Wiessner C. (2003). Targeting monocyte chemoattractant protein-1 signalling in disease. *Expert Opin Ther Targets.* 7(1) : 35-48.

[0384] Ernst CA, Zhang YJ, Hancock PR, Rutledge BJ, Corless CL, Rollins BJ. (1994). Biochemical and biologic characterization of murine monocyte chemoattractant protein-1. Identification of two functional domains. *J Immunol.* 152(7) : 3541-9.

[0385] Friguet B., Chaffotte A. F., Djavadi-Ohanian L., & Goldberg M. E. (1985). Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Meth.* 77, 305-319.

[0386] Frisch, C., Brocks, B., Ostendorp, R., Hoess, A., von Ruden, T., and Kretzschmar, T. (2003). From EST to IHC: human antibody pipeline for target research. *J Immunol Methods* 275, 203-212.

[0387] Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, Rollins BJ, Charo IF. (1999). MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest.* 103(6) : 773-8.

[0388] Haenel C, Satzger M, Della Ducata D, Ostendorp R and Brocks B (2005)

Characterization of High Affinity Antibodies by Electrochemiluminescence-Based Equilibrium Titration (accepted for publication in Analytical Biochemistry)

Hemmerich S, Paavola C, Bloom A, Bhakta S, Freedman R, Grunberger D, Krstenansky J, Lee S, McCarley D, Mulkins M, Wong B, Pease J, Mizoue L, Mirzadegan T, Polsky I, Thompson K, Handel TM, Jarnagin K. (1999). Identification of residues in the monocyte chemoattractant protein-1 that contact the MCP-1 receptor, CCR2. *Biochemistry* 38(40) :13013-25.

[0389] Hughes PM, Allegrini PR, Rudin M, Perry VH, Mir AK, Wiessner C. (2002). Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency is protective in a murine stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 22(3) :308-17.

[0390] Jarnagin K, Grunberger D, Mulkins M, Wong B, Hemmerich S, Paavola C, Bloom A, Bhakta S, Diehl F, Freedman R, McCarley D, Polsky I, Ping-Tsou A, Kosaka A, Handel TM. (1999). Identification of surface residues of the monocyte chemoattractant protein 1 that affect signaling through the receptor CCR2. *Biochemistry.* 38(49) : 16167-77.

[0391] Jimenez-Sainz MC, Fast B, Mayor F Jr, Aragay AM. (2003). Signaling pathways for monocyte chemoattractant protein 1-mediated extracellular signal-regulated kinase activation. *Mol Pharmacol.* 64(3) :773-82.

[0392] Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhofer, G., Hoess, A., Wolle, J., Pluckthun, A., and Virnekas, B. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 296, 57-86.

[0393] Krebs, B., Rauchenberger, R., Reiffert, S., Rothe, C., Tesar, M., Thomassen, E., Cao, M., Dreier, T., Fischer, D., Hoss, A., Inge, L., Knappik, A., Marget, M., Pack, P., Meng, X. Q., Schier, R., Sohlmann, P., Winter, J., Wolle, J., and Kretzschmar, T. (2001). High-throughput generation and engineering of recombinant human antibodies. *J Immunol Methods* 254, 67-84.

[0394] Kretzschmar, T. and von Rüden, T. (2002). Antibody discovery: phage display. *Curr Opin Biotechnol* 13 :598-602.

[0395] Leonard EJ, Yoshimura T. (1990). Human monocyte chemoattractant protein-1. *Immunol Today.* , 11 :97-101. **Löhning, C.** (2001). Novel methods for displaying (poly) peptides/proteins on bacteriophage particles via disulfide bonds. WO 01/05950.

[0396] Losy J, Zaremba J. (2001). Monocyte chemoattractant protein-1 is increased in the cerebrospinal fluid of patients with ischemic stroke. *Stroke.* 32(11) : 2695-6.

[0397] Low, N. M., Holliger, P., Winter, G. (1996). Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. *J. Mol. Biol.* 260, 359-368

[0398] Mahad DJ, Ransohoff RM. (2003). The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in

multiple sclerosis and experimental autoimmuneencephalomyelitis(EAE). *Semin Immunol.* 15(1) :23-32.

[0399] McManus C, Berman JW, Brett FM, Staunton H, Farrell M, Brosnan CF. (1998). MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and insitu hybridization study. *J Neuroimmunol.* 86(1) :20-9.

[0400] Nagy ZA, Hubner B, Lohning C, Rauchenberger R, Reiffert S, Thomassen-Wolf E, Zahn S, Leyer S, Schier EM, Zahradnik A, Brunner C, Lobenwein K, Rattel B, Stanglmaier M, Hallek M, Wing M, Anderson S, Dunn M, Kretzschmar T, Tesar M. (2002).

[0401] Fully human, HLA-DR-specific monoclonal antibodies efficiently induce programmed death of malignant lymphoid cells. *Nat Med.* 8(8) :801-7.

[0402] Nakamura M, Kyo S, Kanaya T, Yatabe N, Maida Y, Tanaka M, Ishida Y, Fujii C, Kondo T, Inoue M, Mukaida N. (2004). hTERT-promoter-based tumor-specific expression of MCP-1 effectively sensitizes cervical cancer cells to a low dose of cisplatin. *Cancer Gene Ther.* 11(1) :1-7.

[0403] Neumark E, Sagi-Assif O, Shalmon B, Ben-Baruch A, Witz IP. (2003). Progression of mouse mammary tumors: MCP-1-TNF α cross-regulatory pathway and clonal expression of pro-malignancy and anti-malignancy factors. *Int J Cancer.* 106(6) :879-86.

[0404] Ni W, Kitamoto S, Ishibashi M, Usui M, Inoue S, Hiasa K, Zhao Q, Nishida K, Takeshita A, Egashira K. (2004).

[0405] Monocyte chemoattractant protein-1 is an essential inflammatory mediator in angiotensin II-induced progression of established atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(3) :534-9.

[0406] Nokihara H, Yanagawa H, Nishioka Y, Yano S, Mukaida N, Matsushima K, Sone S. (2000). Natural killer cell-dependent suppression of systemic spread of human lung adenocarcinoma cells by monocyte chemoattractant protein-1 gene transfection in severe combined immunodeficient mice. *Cancer Res.* 60(24) :7002-7.

[0407] Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mukaida N, Haruma K, Chayama K. (2003). Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human gastric carcinomas. *Int J Oncol.* 22(4) :773-8.

[0408] Piehler, J, Brecht, A., Giersch, T., Hock, B., Gauglitz, G (1997). Assessment of affinity constants by rapid solid phase detection of equilibrium binding in a flow system. *J. Immunol. Meth.* 201, 189-206.

[0409] Prickett, KS, Amberg DC, Hopp TP (1989). A calcium-dependent antibody for identification and purification of recombinant proteins. *Biotechniques.* 7(6) :580-9

[0410] Rauchenberger, R., Borges, E., Thomassen-Wolf, E., Rom, E., Adar, R., Yaniv, Y.,

Malka, M., Chumakov, I., Kotzer, S., Resnitzky, D., Knappik, A., Reiffert, S., Prassler, J., Jury, K., Waldherr, D., Bauer, S., Kretzschmar, T., Yayon, A., and Rothe, C. (2003). Human combinatorial Fab Library yielding specific and functional antibodies against the human fibroblast growth factor receptor 3. *J Biol Chem.* 278(40) : 38194-38205

[0411] Ren G, Dewald O, Frangogiannis NG. (2003). Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2(3) :242-56.

[0412] Rose CE Jr, Sung SS, Fu SM. (2003). Significant involvement of CCL2 (MCP-1) in inflammatory disorders of the lung. *Microcirculation.* 10(3-4) :273-88.

[0413] Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ. (2000). Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1 : direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood.* 96(1) :34-40.

[0414] Sarau HM, Rush JA, Foley JJ, Brawner ME, Schmidt DB, White JR, Barnette MS. (1997). Characterization of functional chemokine receptors (CCR1 and CCR2) on EoL-3 cells : a model system to examine the role of chemokines in cell function. *J Pharmacol Exp Ther.* 283(1) :411-8.

[0415] Sartipy P, Loskutoff DJ. (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(12) :7265-70.

[0416] Schier, R., Bye, J., Apell, G., McCall, A., Adams, G. P., Malmqvist, M., Weiner, L. M. Weiner, Marks, J. D. (1996a).

[0417] Isolation of high-affinity monomeric human anti-c-erbB-2 single chain Fv using affinity-driven selection. *J. Mol. Biol.* 255, 28-43

[0418] Schier, R., McCall, A., Adams, G. P., Marshall, K. W., Merritt, H., Yim, M., Crawford, R. S., Weiner, L. M., Marks, C., Marks, J. D. (1996b). Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementarity determining regions in the center of the antibody binding site. *J. Mol. Biol.* 263, 551-567

[0419] Schmidt, T. G. M., Koepke, J., Frank, R. and Skerra, A. (1996). Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target streptavidin. *J. Mol. Biol.* 255, 753-766

[0420] Seli E, Selam B, Mor G, Kayisli UA, Pehlivan T, Arici A. (2001). Estradiol regulates monocyte chemotactic protein-1 in human coronary artery smooth muscle cells : a mechanism for its antiatherogenic effect. *Menopause.* 8(4) :296-301.

[0421] Sung FL, Zhu TY, Au-Yeung KK, Siow YL, O K. (2002). Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF-kappaB. *Kidney Int.* 62(4) :1160-70.

[0422] Szalai C, Kozma GT, Nagy A, Bojszko A, Krikovszky D, Szabo T, Falus A. (2001). Polymorphism in the gene regulatory region of MCP-1 is associated with asthma susceptibility and severity. *J Allergy Clin Immunol.* 108(3) :375-81.

[0423] Takahashi K, Mizuarai S, Araki H, Mashiko S, Ishihara A, Kanatani A, Itadani H, Kotani H. (2003). Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem.* 278(47) :46654-60.

[0424] Tonouchi H, Miki C, Ohmori Y, Kobayashi M, Mohri Y, Tanaka K, Konishi N, Kusunoki M. (2004). Serum monocyte chemoattractant protein-1 in patients with postoperative infectious complications from gastrointestinal surgery for cancer. *World J Surg.* 28(2) :130-6.

[0425] Van Der Voorn P, Tekstra J, Beelen RH, Tensen CP, Van Der Valk P, De Groot CJ. (1999). Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol.* 154(1) :45-51.

[0426] Voss, S. and Skerra, A. (1997). Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* 10, 975-982 Yamada M, Kim S, Egashira K, Takeya M, Ikeda T, Mimura O, Iwao H. (2003). Molecular mechanism and role of endothelial monocyte chemoattractant protein-1 induction by vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(11) :1996-2001.

[0427] Yang, W., Green, K., Pinz-Sweeney, S., Briones, A. T., Burton, D. R., Barbas III, C. F. (1995). CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into the picomolar range. *J. Mol. Biol.* 254, 392-403

[0428] Yoshimura T, Leonard EJ. (1999). Identification of high affinity receptors for human monocyte chemoattractant protein-1 on human monocytes. *J Immunol.*, 145(1) :292-7.

[0429] Zhu BQ, Heeschen C, Sievers RE, Karliner JS, Parmley WW, Glantz SA, Cooke JP. (2003). Second hand smoke stimulates tumor angiogenesis and growth. *Cancer Cell.* 4(3) :191-6.

[0430] 实例 7 : 表位特异性 MCP-1 抗体

[0431] 表位作图的目的是为了鉴定单克隆抗体识别的特异性抗原区 (表位)。亲和性非常高的抗体的单克隆抗体特异性可以是非常特异性的,使得某些高特异性抗体可对单个氨基酸不同的两个蛋白质分子或对表现出不同三维构象的两个相同分子进行区分。对涉及结合和识别的残基的鉴定可提供非常重要的关于单克隆抗体作用机制的信息。若干方法已被用于鉴定结合至抗体的抗原上的结合表位。用于研究蛋白质-蛋白质相互作用和药物靶标评价的一般方法已被广泛应用 (Tribbick, *J. Immunol. Methods*, 267 :27-35, 2002)。基于亲和性的 A 蛋白酶消化法 (Kelly 等人, *Anal. Chem.*, 74 :1-9, 2002)、肽文库扫描法 (Geysen 等人, *J. Immunol. Methods*, 102 :259-274, 1987)、差别化学修饰法 (differential chemical modification) (Hochleitner 等人, *Protein Sci.* 9 :487-496, 2000)、氢 / 氘 (H/D) 交换法 (Baerga-Ortiz 等人, *Protein Sci.* 11 :1300-1308, 2002) 和位点特异性诱变法 (Perrin 等人, *J. Biol. Chem.* 275 :34393-34398, 2000) 已被应用于定位结合位点。

[0432] 单核细胞趋化蛋白 -1 (MCP-1) 也称为 C-C 趋化因子配体 -2 (CCL-2), 是 76 个氨基酸 (SEQ ID NO :1) 的趋化因子, 其为具有四个保守半胱氨酸残基的蛋白质家族的成员。

MCP-1 通过激活 G 蛋白偶联受体在炎性细胞和非炎性细胞迁移至感染或损伤位点起作用 (Fernandez 和 Lolis, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 42 :469-99, 2002)。受体激活是一分两个步骤的过程, 其中趋化因子特异性结合至受体, 之后化学因子发生构象改变。构象改变使得 N 端能与受体 I 相互作用而使得发生激活 (Fernandez 和 Lolis, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 42 :469-99, 2002)。MCP-1 已被指涉及许多疾病, 包括哮喘、动脉硬化症和自身免疫疾病 (Jarnagin 等人, *Biochemistry*, 38 :16167-16177, 1999)。血管生成试验已证实, 用抗体阻断 CCL-2 活性抑制了乳癌肿瘤模型中的血管生成。

[0433] MCP-1 与其受体的构效关系已经使得能鉴别涉及受体结合和激活的关键残基 (Paavola 等人, *J of Biol Chem*, 273 :33157-33165, 1998)。人 MCP-1 上负责与 CCR2 结合和 CCR2 激活的区域以及 MCP-1 特异性中和抗体的表位的鉴定确定了这些抗体阻断 MCP-1 生物活性的机制。定位对抗人 MCP-1 单克隆抗体来说关键的区域将提供有价值的有关新治疗候选物确切靶标的信息并有助于确定作用机制。

[0434] Centocor 进行的血管生成研究已经证实, 用特异性单克隆抗体阻断 MCP-1 (CCL-2) 活性可抑制乳癌肿瘤模型中的血管生成。基于该结果, CNT0888 (人 IgG1k) 和 C775A (鼠 IgG1k) 这两种抗人 MCP-1 中和单克隆抗体被选作潜在的治疗和替代抗体候选物。CNT0 888 上中和活性所需的残基的鉴定可有助于理解抑制机制以及开发知识产权。

[0435] CNT0 888 识别人 MCP-1 而非 MCP-2。而且, CNT0 888 识别人 MCP-1 而非鼠同系物。基于序列比对, 人 MCP-1 和小鼠 MCP-1 表现具有大约 60% 的同源性。使用序列分析, 使得能基于该人和鼠蛋白质之间的特异性残基的交换来设计 MCP-1 变体。在大肠杆菌中表达了重组 MCP-1 蛋白并通过逆相高效液相色谱 (RP-HPLC) 进行纯化。通过 SDS-PAGE 估计了 MCP-1 和变体两者的大小和纯度并通过圆二色性评价了蛋白质的二级结构。将表面等离子共振 (Biacore) 和 ELISA 用于评价 MCP-1 变体与 CNT0 888 或 C775A 的结合亲和力。结合数据表明, CNT0 888 对 MCP-1 的结合亲和力远高于对 C775A 的亲和力 (39pM 对 3nM)。突变分析显示, MCP-1 残基₄AINA₇ (位于 N-端) 和₄₆IV₄₇ (位于 β_2 和 β_3 链之间的环区) 对人 MCP-1 上的 CNT0 888 结合表位有贡献。将诱变数据与 MCP-1 的结构相结合, 我们已发展了用与 CNT0 888 和 hMCP-1 之间相互作用的模型。我们的模型与描述 MCP-1 和 CCR2 相互作用的诱变和结构数据相关性好。

[0436] 采用了多种技术来鉴定 CNT0 888 所识别的人 MCP-1 上的结合表位。CNT0 888 是与 Morphosys 合作并在 Centocor 制备的源自噬菌体展示的人 IgG1。下面描述了该抗体的表位作图和表征。

[0437] CNT0 888 与人 MCP-1 的结合特异性

[0438] 为了检验 CNT0 888 与人 MCP-1 和 MCP-2 的结合特异性, 进行了结合 ELISA。在室温下, 将 5 μ l (20 μ g/ml) 的 MCP-1 或 MCP2 蛋白包被在 MSDHighBind 板 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) 每个孔上 1 小时。将 100 和 50 毫升 5% MSD Blocker A 缓冲液 (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, MD) 加至每孔并在室温下孵育 1 小时。用 0.1M HEPES 缓冲液, pH 7.4 洗板三次, 然后加入 25 μ l 表达的 IL-13 上清液并在室温下孵育 1 小时, 轻轻摇动。孵育后, 用 HEPES 缓冲液, pH 7.4 洗板 3 次。将 MSD Sulfo-tag 标记的 CNT0 888 或 C775 系列稀释 (从 1 μ g/mL 至 0) 并以 25 μ L 体积加至指定的孔中, 室温下伴随振动孵育 2 小时。孵育后, 用 0.1M HEPES 缓冲液 (pH 7.4) 洗板 3 次。用蒸馏水稀释 MSD

Read Buffer T(4 倍稀释)并以 150 μ L/ 孔的体积进行分配,用 SECTOR Imager 6000 分析。结果表明,两种 mAb (CNT0 888 和 C775) 均结合至人 MCP-1,但不与 MCP-2 蛋白结合。

[0439] 通过突变分析对 CNT0 888 进行表位作图

[0440] 为了鉴定对 CNT0 888 结合有贡献的特异性残基,进行了突变分析。将确定的残基单独用 MCP-2 上的对应残基进行替换。表 9 中显示了序列比对。

[0441]

	(1)	1	10	20	30	40	50	60	76
HuMC	(1)	QPD	AIN	APVTCCYNFTNRKISVQRLASYRRITSSKCPKEAVIFKTI	VAKEICADPKQKWVQDSMDHLDKQTQTPKT				
P-1									
HuMC	(1)	QPD	SVIPI	TCCFNVINRKIPIQRLESYTRITNIQCPKEAVIFKTKRGKEVCADPKERWVRDSMKHLDQIFQNLKP					
P-2									
共有	(1)	QPD	AI	PITCCFN	NRKI	IQRL	SY	RIT	CPKEAVIFKT
序列									AKEICADPK KWV DSM HLD Q K

[0442] 通过定点诱变构建了九种 MCP-1 变体。另外,将对二聚化界面核心有贡献的两个残基 (Paavola 等人, J of Biol Chem, 273 :33157-33165, 1998) 单独用丙氨酸进行替换。突变分析所针对的残基在 10 中示出。

[0443] 表 10

[0444]

MCP-1 变体	序列变化
#1	$_{33}\text{SSK}_{35} \rightarrow _{33}\text{NIQ}_{35}$
#2	$_{6}\text{NA}_7 \rightarrow _{6}\text{SL}_7$,
#3	$_{15}\text{FT}_{16} \rightarrow _{15}\text{VI}_{16}$
#4	$_{29}\text{R} \rightarrow _{29}\text{T}$
#5	$_{46}\text{IV}_{47} \rightarrow _{46}\text{KR}_{47}$
#6	$_{66}\text{D} \rightarrow _{66}\text{K}$
#7	$_{4}\text{AINA}_{7..} \rightarrow _4\text{SVSI}_7$
#8	$_{4}\text{AINA}_{7..} \rightarrow _4\text{GGGG}_7$
#9	$_{4}\text{AINA}_{7...46}\text{IV}_{47} \rightarrow _4\text{SVSI}_{7...46}\text{KR}_{47}$
单体变体	序列变化
#1	$_{8}\text{P} \rightarrow _8\text{A}$

MCP-1 变体	序列变化
#2	$_{13}\text{Y} \rightarrow 13\text{A}$

- [0445]
- [0446] 变体蛋白是用 Quik Change Site Directed Mutagenesis Kit (快变定点诱变试剂盒) (Stratagene) 进行构建。通过 DNA 测序确定全部序列。然后将质粒转化进 Origami DE3 PlysS 细胞中。通过将 5 μg 的所有样品在 4-12% Bis-Tris NuPage Gel 上进行电泳来检验 MCP-1 变体的表达。
- [0447] 为了检验蛋白质正确折叠,利用圆二色性 (CD) 将 MCP-1 变体的二级结构与 wt-MCP-1 的二级结构进行比较。利用在 280nm 处的吸收 (A_{280}) 来确定浓度。使用了未稀释的 HuMCP-1-His6 和 HuMCP-1-His6 变体样品。在用 D-PBS 对仪器归零后,读取 A_{280} 读数。所使用的消光系数为 $8730\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$,变体 Y13A 除外,对于 Y13A,所用的消光系数为 $7450\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 。基于所提供的浓度值,计算 CNT0 888 的浓度。
- [0448] CD 试验用 215 型 AVIV CD 仪 (AVIV Biomedical, Lakewood, NJ) 进行。对于所有试验,使用了路径长为 0.1cm 的矩形比色皿。HuMCP-1-His6 和 HuMCP-1-His6 变体在 D-PBS 中制备为 20 μM ,记录从 260 至 193nm 的光谱。对于该光谱分析,计算了平均残基摩尔椭圆率 [Θ ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$)]。数据显示,所有变体的一般结构特点相似。根据 CD 谱,变体 P8A 和 Y13A 看起来变得更紧凑,变体 5、8 和 9 看起来较不紧凑;然而它们没有去折叠。去折叠样品的光谱特征为无规卷曲,如活性 (折叠的) 变体 3 和失活 (去折叠的) 变体 3 所表明
- [0449] 为了评估 CNT0 888 对野生型 MCP-1 和变体的结合特异性,进行了结合 ELISA。将 5 μl (40 $\mu\text{g/ml}$) 的人 MCP-1 或 MCP-2 包被于 MSD High Bind 板上并利用先前所述程序进行 ELISA。ELISA 数据表明,变体 2、5、7、8 和 9 表现出较低的结合活性,与野生型和其他变体 1、3 和 6 比较,约为 30%。
- [0450] 利用光散射表征单体 MCP-1 变体
- [0451] 为了确认两种 MCP-1 变体 (P8A 和 Y13A) 是单体,进行了 StaticLight Scattering (静态光散射) (SLS)。将与 SLS 联合的分子排阻柱 (SEC) 用于测定野生型 MCP-1 和 MCP-1 变体 (变体 P8A 和 Y13A) 的溶液 MW 值。这些肽的预计单体 MW 值全部约为 10kDa。wtMCP-1 可重复地洗脱为单峰,测定的 MW 值为约 20kDa,这与二聚体形式相符合。基于所提供的浓度,回收率为约 62%。变体 P8A 洗脱为单峰,测定的 MW 值为约 11kDa,这与单体相符合。回收率为 64%。变体 Y13A 洗脱为双峰。上样量的主峰 (约 73%) 的测定浓度为约 12kDa,这与单体相符合。第二个峰占蛋白质上样量的约 5%,测定的 MW 为约 24kDa,类似二聚体。总体的回收率为 80%。结果显示,P8A 和 Y13A 两者确实为单体,而 Y13A 表现为小部分为二聚体。这些数据与参考文献相符 (Paavola 等人, J of Biol Chem, 273 :33157-33165, 1998)。
- [0452] 另外,进行了 ELISA 结合以评价 CNT0 888 mAb 与单体变体的结合活性。结果显示, CNT0 888 与同型二聚体 wtMCP-1 的结合好于与单体变体的结合。
- [0453] CNT0 888 与多种 MCP-1 变体的结合亲和力的表征

[0454] 将全部变体与野生型 MCP-1 相比较,通过 Biacore 评估结合亲和力 (kd)。使用 Biacore 3000 光学生物传感器 (Biacore AB, Piscataway, NJ) 进行表面等离子共振。如下所述制备等离子表面。用 $2 \times 20 \mu\text{L}$ 的 mM NaOH 预处理研究级 CM-5 传感器芯片,然后用 $2 \times 20 \mu\text{L}$ 的 100mM HCl 和 $2 \times 20 \mu\text{L}$ 的 0.1% SDS 预处理,在试剂注射之间用去离子水进行注射。用 10mM 醋酸钠缓冲液 pH 4.5 对 1.8mg/mL 的山羊抗人 IgG Fc γ 片段进行 101 倍稀释,并利用关于胺偶联化学的制造商说明书将其偶联至 CM-5 芯片的羧甲基化葡聚糖表面 (Johnsson 等人, Anal Biochem 198 :268-277, 1991)。概括地说,用 $50 \mu\text{L}$ 的 NHS/EDC 混合物以 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ 的流速活化传感器表面。这之后,注射 $50 \mu\text{L}$ 小鼠抗人 IgG。通过以 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ 注射 $50 \mu\text{L}$ 乙醇胺 -HCl 使表面上剩余的活性基团失活。

[0455] 该试验在 25°C 下进行,至少两次。以程序化方法进行该试验。为了进行动力学试验,将 HuMCP-1-His6 和 HuMCP-1-His6 变体的母液稀释进 D-PBS 中。将这些样品稀释至 0.3 至 10nM 的浓度。将 10.5mg/mL 的 CNT0 888 溶液稀释至 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。将该溶液以 $5 \mu\text{L}/\text{min}$ 注射至流动细胞 2 以捕获 CNT0888。流动细胞 1 用作参照。注射 CNT0 888 后,以 $50 \mu\text{L}/\text{min}$ 注射 $180 \mu\text{L}$ 的 HuMCP-1-His6 或 HuMCP-1-His6 变体 (结合相),然后用缓冲液流动 600 或 1800 秒 (解离相)。通过以 $60 \mu\text{L}/\text{min}$,注射 $20 \mu\text{L}$ 的 100mM H_3PO_4 ,然后注射 $10 \mu\text{L}$ 的 50mM NaOH,使芯片表面再生。为了分析数据,通过将缓冲液注射 (代替抗原注射) 所产生的数据从已减除参照的数据减除,来进行双参照减除 (Myszka, D. G., J Mol. Recognit., 12 : 279-284, 1999)。使用 BIAevaluation 软件 (4.0.1 版) (Biacore, AB),采用 1 : 1 的结合模型进行数据的整体分析。结果汇总于表 11 中。

[0456] 表 11 :CNT0 888 的 Biacore 汇总

[0457]

样品	$k_a (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	$k_d (\text{s}^{-1})$	$K_D (\text{pM})$
WT MCP-1	$(5.21 \pm 0.65) \times 10^6$	$(2.0 \pm 0.16) \times 10^{-4}$	38 ± 6
变体 -1	3.96×10^6	1.43×10^{-4}	36.1
变体 -2	$(2.45 \pm 0.89) \times 10^6$	$(2.33 \pm 0.16) \times 10^{-4}$	96 ± 36
变体 -3	$(6.67 \pm 2.16) \times 10^6$	$(1.85 \pm 0.45) \times 10^{-4}$	28 ± 11
变体 -4	$(1.74 \pm 0.11) \times 10^6$	$(1.94 \pm 0.07) \times 10^{-4}$	111 ± 8
变体 -5	$(7.96 \pm 2.36) \times 10^4$	$(1.57 \pm 0.03) \times 10^{-2}$	$197 \pm 58.5 \text{ nM}$
变体 -6	$(5.09 \pm 2.3) \times 10^6$	$(1.86 \pm 0.19) \times 10^{-4}$	37 ± 17
变体 -7	9.32×10^5	2.47×10^{-4}	265
变体 -8	$(3.84 \pm 0.01) \times 10^6$	$(2.88 \pm 0.01) \times 10^{-4}$	78 ± 0.29

样品	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (pM)$
变体 -9	$(6.12 \pm 0.19) \times 10^5$	$(1.11 \pm 0.01) \times 10^{-2}$	$181 \pm 58.9nM$
变体 -P8A	$(4.37 \pm 0.01) \times 10^6$	$(2.78 \pm 0.01) \times 10^{-4}$	64 ± 0.27
变体 -Y13A	$(4.12 \pm 0.01) \times 10^6$	$(2.71 \pm 0.01) \times 10^{-4}$	66 ± 0.23

[0458] 对于变体 -5 和变体 -9,随着突变,CNT0 888 与 MCP-1 的结合亲和力显著降低。这些结果显示,MCP-1 残基₄AINA₇(位于 N-端)和₄₆IV₄₇(位于 β_2 和 β_3 链之间的环区)有对 CNT0 888 结合表位有贡献。然而,对于单体 P8A 和 Y13A,结合亲和力被影响的程度较轻。

[0459] E. CNT0 888 和 C775 单克隆抗体之间与人 MCP-1 蛋白的结合特异性的比较

[0460] 为了进一步研究另一单克隆抗体 C775 的结合表位并将其结合位点与 CNT0 888 比较,通过 Biacore 对 C775mAb 与 MCP-1 变体的结合亲和力进行评价。使用先前描述的程序,进行了动力学分析。数据显示, MCP-1 上的 CNT0 888 和 C775 的表位显著不同。表 12 中,与野生型 MCP-1 (3.1nM) 相比,变体 -6、D₆₆ → K 与 C775 结合的结合亲和力 (27.7nM) 要低 9 倍。在同型二聚体和单体 MCP-1 蛋白之间结合亲和力没有差别。

[0461] 表 12 :C775 的 Biacore 汇总

[0462]

样品	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (nM)$
WT MCP-1	$(1.64 \pm 0.6) \times 10^6$	$(5.03 \pm 0.31) \times 10^{-3}$	3.1 ± 0.2
变体 -1	1.6×10^6	3.40×10^{-3}	2.0
变体 -2	$(8.68 \pm 0.3) \times 10^5$	$(5.48 \pm 0.51) \times 10^{-3}$	6.3 ± 0.6
变体 -3	$(1.66 \pm 0.01) \times 10^6$	$(7.40 \pm 0.01) \times 10^{-3}$	4.5
变体 -4	8.8×10^5	2.70×10^{-3}	3.0
变体 -5	$(1.64 \pm 0.27) \times 10^6$	$(2.78 \pm 2.92) \times 10^{-3}$	1.7 ± 0.18
变体 -6	$(1.95 \pm 0.01) \times 10^5$	$(5.41 \pm 0.04) \times 10^{-3}$	27.7
变体 -7	7.2×10^5	3.27×10^{-3}	4.5
变体 -8	$(1.73 \pm 0.01) \times 10^6$	$(9.47 \pm 0.07) \times 10^{-3}$	5.5
变体 -9	$(3.16 \pm 0.01) \times 10^6$	$(5.31 \pm 0.04) \times 10^{-3}$	1.7

样品	$k_a (M^{-1}s^{-1})$	$k_d (s^{-1})$	$K_D (nM)$
变体 -P8A	$(1.75 \pm 0.02) \times 10^6$	$(4.48 \pm 0.06) \times 10^{-3}$	2.6
变体 -Y13A	$(1.79 \pm 0.02) \times 10^6$	$(3.00 \pm 0.03) \times 10^{-3}$	1.7

[0463] 为了比较 CNT0 888 mAb 和 C775 mAb 与 MCP-1 变体的结合特异性,进行了 ELISA 结合分析,数据显示,那些残基变体 ($_4\text{A1NA}_7$ 和 $_{46}\text{IV}_{47}$) 和单体变体 (P8A 和 Y13A) 与 CNT0 888 的结合表现出大于 60% 的减少,而与 C775 的结合则没有。残基 Asp66 (位于 C-端 α -螺旋) 对 C775 mAb 的结合表位有显著贡献。

[0464] F. 用光散射法表征 CNT0 888/MCP-1 复合物

[0465] 为了表征结合至 MCP-1 蛋白的 CNT0 888 的化学计量学,通过光散射法表征了 CNT0 888 与野生型 MCP-1 和与单体 MCP-1 变体 P8A 的复合物。通过联合 SLS 的 SEC 对 CNT0 888 与过量 wtMCP-1 或 P8A 蛋白的混合物进行分析以测定 mAb-MCP1 复合物的溶液 MW。对于 CNT0 888,90% 的样品由 155kDa 的洗脱峰 (该 IgG 构成)。以 6.7uM mAb :202uM MCP-1 比率加入 PBS 的 CNT0888 与 wtMCP-1 或 P8A 的混合物显示,它们的分子量分布不同,反映了蛋白质结合状态的不同。与 CNT0 888 的野生型 MCP-1 复合物大,MW 在 230kDa-360kDa 之间。变体 P8A 复合物的 MW 分布中,60% 为大复合物 (峰 > 230kDa),40% 为较小的峰 (< 180-230kDa)。360kDa 复合物 (主要见于 wtMCP1) 可能是由与两个 IgG 分子结合的两个二聚体构成,而 180kDa 复合物 (仅见于 P8A) 可能是有与一个 IgG 分子结合的两个单体构成。

[0466] 概括地说,这些结果表明,单体 P8A 形成了包括单个 IgG 分子的较低分子量的复合物,而 wtMCP1 形成的复合物看起来整合了可能结合两个二聚体的多达两个 IgG 分子。将 CNT0 888/MCP-1 复合物的结合数据与光散射分析结合考虑,我们提出了一种模型。该假想模型认为, CNT0 888 结合至同型二聚体 MCP-1 蛋白并形成 2 IgG-2 二聚体 MCP-1 复合物。有可能是, CNT0888 可促进单体 MCP-1 (如 P8A) 形成同型二聚体并导致形成具有 2 IgG-1 二聚体 P8A 的复合物。

[0467] 优势

[0468] 在该研究中,我们利用了关于 CNT0 888 对人 MCP-1 和 MCP-2 的结合特异性的信息,结合定点诱变来鉴定 hMCP-1 上 CNT0 888 的结合表位。这种靶向方法使得能完整地表征变体蛋白质和单克隆抗体之间的结合活性,并且构成了靶向特异性残基来中和 hMCP-1 活性的基础。我们确定了 hMCP-1 上的两组残基,即 $_4\text{A1NA}_7$ (SEQ ID NO:1 的氨基酸 4-7) 和 $_{46}\text{IV}_{47}$ (SEQ ID NO:1 的氨基酸 46-47),它们对 CNT0 888 的结合表位有贡献。此外,利用 hMCP-1 的结构,我们已发展了 CNT0 888 与 hMCP-1 之间相互作用的模型,并提出了假说来支持 CNT0 888 抑制 hMCP-1 的机制。

[0469] 基于表位信息和化学计量,有可能设计 MCP-1 拮抗剂。例如,这些关键残基可发展策略来鉴定其他 MCP-1 拮抗剂。这种拮抗剂可用于改变 MCP-1/CCR2 相互关系所介导的疾病。而且,中和 MCP-1 上的表位的知识可用于设计试剂以使得能用利用体外展示技术来选择其他 MCP-1 拮抗剂。

[0470] 参考文献:

- [0471] Beall, C. J., Mahajan, S., and Kolattukudy, P. E. (1992) Conversion of Monocyte Chemoattractant Protein-1 into a neutrophil attractant by substitution of two amino acids. *J. Biol. Chem.* 267 :3455-3459.
- [0472] Dehqanzada, Z. A., Storrer, C. E., Hueman, M. T., Foley, R. J., Harris, K. A., Jama, Y. H., Kao, T. C., Shriver, C. D., Ponniah, S., and Peoples, G. (2006) Correlations between serum Monocyte Chemotactic Protein-1 levels, clinical prognostic factor, and HER-2/neu vaccine-related immunity in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 12 : 478-486.
- [0473] Fernandez, E. J. and Lolis, E. (2002) Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42 :469-499.
- [0474] Jarnagin, K., Grunberger, D., Mulkins, M., Wong, B., Hemmerich, S., Paavola, C., Bloom, A., Bhakta, S., Diehl, F., Freedman, R., McCarley, D., Polsky, I., Ping-Tsou, A., Kosaka, A., and Handel, T. M. (1999) Identification of surface residues of the Monocyte Chemotactic Protein 1 that affect signaling through the receptor CCR2. *Biochemistry.* 38 :16167-16177.
- [0475] Johnsson, B., Lofas, S., and Lindquist, G. (1991). Immobilization of proteins to a carboxymethyl dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors. *Anal Biochem* 198 : 268-77. Monteclaro, F. S. and Charo I. F. (1997) The amino-terminal domain of CCR2 is both necessary and sufficient for high affinity binding of Monocyte Chemoattractant Protein 1. *J. Biol. Chem.* 272 :23186-23190.
- [0476] Myszk, D. G., (1999) Improving Biosensor analysis, *J. Mol. Recognit.* 12 : 279-284.
- [0477] Paavola, C. D., Hemmerich, S., Grunberger, D., Polsky, I., Bloom, A., Freedman, R., Mulkins, M., Bhakta, S., McCarley, D., Wiesent, L., Wong, B., Jarnagin, K., and Handel, T. M. (1998) Monomeric Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) binds and activates the MCP-1 receptor CCR2B. *J. Biol. Chem.* 273 :33157-33165.
- [0478] Steitz, S. A., Hasegawa, K., Chiang, S. L., Cobb, R. R., Castro, M. A., Lobl, T. J., Yamada, M., Lazarides, E., and Cardearelli, P. M. (1998) *FEBS Letters.* 430 :158-164.
- [0479] Zhang, Y. J., Rutledge, B. J., and Rollins, B. J. (1994) Structure/Activity analysis of human Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1) by Mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 269 :15918-15924.
- [0480] Zhang, Y. J., and Rollins, B. J. (1995) A dominant negative inhibitor indicates that Monocyte Chemoattractant Protein 1 functions as a dimer. *Mol and Cell Bio.* 15 :4851-4855.
- [0481] Zhang, Y., Ernst, C. A., and Rollins, B. J. (1996) MCP-1 : Structure/Activity Analysis. *Methods : Comp Meth Enzym.* 10 :93-103.
- [0482] 显而易见的是,本发明可以不同于前述说明书和实例中具体描述的方式来实践。

[0483] 按照上面的教导,本发明的多种修改形式和变型形式是可能的,并因而在所附权利要求的范围内。

[0484] 序列表

[0485] <110>Das, Anuk

[0486] Sweet, Raymond

[0487] Tsui, Ping

[0488] Bethea, Deidra

[0489] Kang, James

[0490] Baker, Audrey

[0491] Wu, Sheng-Jiun

[0492] <120> 表位特异性抗 -MCP1 抗体、组合物、方法和用途

[0493] <130>CEN5188 PSP

[0494] <160>28

[0495] <170>PatentIn 3.3 版

[0496] <210>1

[0497] <211>76

[0498] <212>PRT

[0499] <213> 智人 (Homo sapiens)

[0500] <220>

[0501] <221> 变体

[0502] <222>(1).. (1)

[0503] <223>Xaa 可以是 Gln、Glu 或焦谷氨酸

[0504] <220>

[0505] <221> 变体

[0506] <222>(40).. (40)

[0507] <223>Xaa 可以是 Ala 或 Ser

[0508] <220>

[0509] <221> 变体

[0510] <222>(41).. (41)

[0511] <223>Xaa 可以是 Val 或 Ile

[0512] <220>

[0513] <221> 变体

[0514] <222>(43).. (43)

[0515] <223>Xaa 可以是 Phe 或 Tyr

[0516] <220>

[0517] <221> 位点

[0518] <222>(69).. (69)

[0519] <220>

[0520] <221> 位点

- [0521] <222>(75).. (75)
- [0522] <223> 缀合位置, 如生物素或 PEG- 生物素
- [0523] <400>1
- [0524] Xaa Pro Asp Ala Ile Asn Ala Pro Val Thr Cys Cys Tyr Asn Phe Thr
- [0525] 1 5 10 15
- [0526] Asn Arg Lys Ile Ser Val Gln Arg Leu Ala Ser Tyr Arg Arg Ile Thr
- [0527] 20 25 30
- [0528] Ser Ser Lys Cys Pro Lys Glu Ala Xaa Ile Xaa Lys Thr Ile Val Ala
- [0529] 35 40 45
- [0530] Lys Glu Ile Cys Ala Asp Pro Lys Gln Lys Trp Val Gln Asp Ser Met
- [0531] 50 55 60
- [0532] Asp His Leu Asp Lys Gln Thr Gln Thr Pro Lys Thr
- [0533] 65 70 75
- [0534] <210>2
- [0535] <211>119
- [0536] <212>PRT
- [0537] <213> 人
- [0538] <220>
- [0539] <221>FR1
- [0540] <222>(1).. (25)
- [0541] <220>
- [0542] <221>CDR1
- [0543] <222>(26).. (35)
- [0544] <223> 简并的
- [0545] <220>
- [0546] <221>FR2
- [0547] <222>(36).. (46)
- [0548] <223> 简并的
- [0549] <220>
- [0550] <221>CDR2
- [0551] <222>(47).. (66)
- [0552] <223> 简并的
- [0553] <220>
- [0554] <221>FR3
- [0555] <222>(67).. (98)
- [0556] <220>
- [0557] <221>CDR3
- [0558] <222>(99).. (108)
- [0559] <220>

[0560] <221>FR4
[0561] <222>(109).. (119)
[0562] <400>2
[0563] Gln Val Glu Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0564] 1 5 10 15
[0565] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
[0566] 20 25 30
[0567] Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0568] 35 40 45
[0569] Gly Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Gln Lys Phe
[0570] 50 55 60
[0571] Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[0572] 65 70 75 80
[0573] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0574] 85 90 95
[0575] Ala Arg Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
[0576] 100 105 110
[0577] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0578] 115
[0579] <210>3
[0580] <211>109
[0581] <212>PRT
[0582] <213>人
[0583] <220>
[0584] <221>FR1
[0585] <222>(1).. (23)
[0586] <220>
[0587] <221>CDR1
[0588] <222>(24).. (35)
[0589] <220>
[0590] <221>FR2
[0591] <222>(36).. (46)
[0592] <220>
[0593] <221>CDR2
[0594] <222>(47).. (57)
[0595] <220>
[0596] <221>FR3
[0597] <222>(58).. (89)
[0598] <220>

- [0599] <221> 变体
- [0600] <222> (90).. (90)
- [0601] <223>X 可以是 H 或 Q
- [0602] <220>
- [0603] <221>CDR3
- [0604] <222> (90).. (97)
- [0605] <220>
- [0606] <221> 变体
- [0607] <222> (94).. (94)
- [0608] <223>X 可以是 Glu、Gln、Asp、Ser、Thr 或 Phe
- [0609] <220>
- [0610] <221> 变体
- [0611] <222> (95).. (95)
- [0612] <223>X 可以是 Leu、Ile、His、Tyr、Phe 或 Gln
- [0613] <220>
- [0614] <221> 变体
- [0615] <222> (96).. (96)
- [0616] <223>X 可以是 Trp、His、Ser、脯氨酸
- [0617] <220>
- [0618] <221> 变体
- [0619] <222> (97).. (97)
- [0620] <223>X 可以是 Ala、Val、Asn、Gln、Ser 或脯氨酸
- [0621] <220>
- [0622] <221> 变体
- [0623] <222> (98).. (98)
- [0624] <223>X 可以不存在或是 Phe 或 Met
- [0625] <220>
- [0626] <221>FR4
- [0627] <222> (98).. (109)
- [0628] <220>
- [0629] <221>FR4
- [0630] <222> (99).. (109)
- [0631] <400>3
- [0632] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
- [0633] 1 5 10 15
- [0634] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Ala
- [0635] 20 25 30
- [0636] Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
- [0637] 35 40 45

[0638] Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 [0639] 50 55 60
 [0640] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 [0641] 65 70 75 80
 [0642] Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Xaa Gln Tyr Ile Xaa Xaa Xaa
 [0643] 85 90 95
 [0644] Xaa Xaa Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 [0645] 100 105
 [0646] <210>4
 [0647] <211>120
 [0648] <212>PRT
 [0649] <213> 人
 [0650] <220>
 [0651] <221>FR1
 [0652] <222>(1).. (25)
 [0653] <220>
 [0654] <221>CDR1
 [0655] <222>(26).. (35)
 [0656] <220>
 [0657] <221>FR2
 [0658] <222>(36).. (46)
 [0659] <220>
 [0660] <221>CDR2
 [0661] <222>(47).. (66)
 [0662] <220>
 [0663] <221>FR3
 [0664] <222>(67).. (98)
 [0665] <220>
 [0666] <221>CDR3
 [0667] <222>(99).. (110)
 [0668] <220>
 [0669] <221>FR4
 [0670] <222>(111).. (120)
 [0671] <400>4
 [0672] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0673] 1 5 10 15
 [0674] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr
 [0675] 20 25 30
 [0676] Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0677]	35	40	45
[0678]	Ser Asn Ile Arg Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[0679]	50	55	60
[0680]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0681]	65	70	75
[0682]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0683]	85	90	95
[0684]	Ala Arg Phe Glu Phe Thr Pro Trp Thr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln		
[0685]	100	105	110
[0686]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0687]	115	120	
[0688]	<210>5		
[0689]	<211>107		
[0690]	<212>PRT		
[0691]	<213> 人		
[0692]	<220>		
[0693]	<221>FR1		
[0694]	<222>(1).. (22)		
[0695]	<220>		
[0696]	<221>CDR1		
[0697]	<222>(23).. (33)		
[0698]	<220>		
[0699]	<221>FR2		
[0700]	<222>(34).. (44)		
[0701]	<220>		
[0702]	<221>CDR2		
[0703]	<222>(45).. (55)		
[0704]	<220>		
[0705]	<221>FR3		
[0706]	<222>(56).. (87)		
[0707]	<220>		
[0708]	<221>CDR3		
[0709]	<222>(88).. (97)		
[0710]	<220>		
[0711]	<221> 变体		
[0712]	<222>(89).. (89)		
[0713]	<223>Xaa 可以是 Ser 或 Thr		
[0714]	<220>		
[0715]	<221> 变体		

- [0716] <222>(91).. (91)
- [0717] <223>Xaa 可以是 Asp 或 Thr
- [0718] <220>
- [0719] <221> 变体
- [0720] <222>(92).. (92)
- [0721] <223>Xaa 可以是 Arg 或 Ala
- [0722] <220>
- [0723] <221> 变体
- [0724] <222>(93).. (93)
- [0725] <223>Xaa 可以是 Gln 或 Phe
- [0726] <220>
- [0727] <221> 变体
- [0728] <222>(96).. (96)
- [0729] <223>Xaa 可以是 Thr 或 Ala
- [0730] <220>
- [0731] <221> 变体
- [0732] <222>(97).. (97)
- [0733] <223>Xaa 可以是 Ala、Gly 或 Ser
- [0734] <220>
- [0735] <221>FR4
- [0736] <222>(98).. (107)
- [0737] <400>5
- [0738] Asp Ile Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
- [0739] 1 5 10 15
- [0740] Thr Ala Arg Ile Ser Cys Ser Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Tyr Val
- [0741] 20 25 30
- [0742] Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
- [0743] 35 40 45
- [0744] Asp Asp Asp Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
- [0745] 50 55 60
- [0746] Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Glu
- [0747] 65 70 75 80
- [0748] Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Ser Ser Xaa
- [0749] 85 90 95
- [0750] Xaa Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
- [0751] 100 105
- [0752] <210>6
- [0753] <211>10
- [0754] <212>PRT

- [0755] <213> 人
- [0756] <400>6
- [0757] Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Ile Ser
- [0758] 1 5 10
- [0759] <210>7
- [0760] <211>20
- [0761] <212>PRT
- [0762] <213> 人
- [0763] <400>7
- [0764] Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln
- [0765] 1 5 10 15
- [0766] Lys Phe Gln Gly
- [0767] 20
- [0768] <210>8
- [0769] <211>20
- [0770] <212>PRT
- [0771] <213> 人
- [0772] <400>8
- [0773] Trp Met Gly Ala Ile Asn Pro Leu Ala Gly His Thr His Tyr Ala Gln
- [0774] 1 5 10 15
- [0775] Lys Phe Gln Gly
- [0776] 20
- [0777] <210>9
- [0778] <211>10
- [0779] <212>PRT
- [0780] <213> 人
- [0781] <400>9
- [0782] Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe
- [0783] 1 5 10
- [0784] <210>10
- [0785] <211>10
- [0786] <212>PRT
- [0787] <213> 人
- [0788] <400>10
- [0789] Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Gly Met Ser
- [0790] 1 5 10
- [0791] <210>11
- [0792] <211>20
- [0793] <212>PRT

- [0794] <213> 人
- [0795] <400>11
- [0796] Trp Val Ser Asn Ile Arg Ser Asp Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp
- [0797] 1 5 10 15
- [0798] Ser Val Lys Gly
- [0799] 20
- [0800] <210>12
- [0801] <211>11
- [0802] <212>PRT
- [0803] <213> 人
- [0804] <400>12
- [0805] Phe Glu Phe Thr Pro Trp Thr Tyr Phe Asp Phe
- [0806] 1 5 10
- [0807] <210>13
- [0808] <211>12
- [0809] <212>PRT
- [0810] <213> 人
- [0811] <400>13
- [0812] Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Ala Tyr Leu Ala
- [0813] 1 5 10
- [0814] <210>14
- [0815] <211>11
- [0816] <212>PRT
- [0817] <213> 人
- [0818] <400>14
- [0819] Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
- [0820] 1 5 10
- [0821] <210>15
- [0822] <211>9
- [0823] <212>PRT
- [0824] <213> 人
- [0825] <400>15
- [0826] His Gln Tyr Ile Glu Leu Trp Ser Phe
- [0827] 1 5
- [0828] <210>16
- [0829] <211>9
- [0830] <212>PRT
- [0831] <213> 人
- [0832] <400>16

[0833] His Gln Tyr Ile Gln Leu His Ser Phe
[0834] 1 5
[0835] <210>17
[0836] <211>8
[0837] <212>PRT
[0838] <213> 人
[0839] <400>17
[0840] His Gln Tyr Ile Phe Tyr Pro Asn
[0841] 1 5
[0842] <210>18
[0843] <211>11
[0844] <212>PRT
[0845] <213> 人
[0846] <400>18
[0847] Ser Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Tyr Val Tyr
[0848] 1 5 10
[0849] <210>19
[0850] <211>11
[0851] <212>PRT
[0852] <213> 人
[0853] <400>19
[0854] Leu Val Ile Tyr Asp Asp Asp Asn Arg Pro Ser
[0855] 1 5 10
[0856] <210>20
[0857] <211>10
[0858] <212>PRT
[0859] <213> 人
[0860] <400>20
[0861] Gln Thr Tyr Asp Arg Phe Ser Ser Thr Ala
[0862] 1 5 10
[0863] <210>21
[0864] <211>10
[0865] <212>PRT
[0866] <213> 人
[0867] <400>21
[0868] Gln Ser Tyr Asp Arg Phe Ser Ser Thr Gly
[0869] 1 5 10
[0870] <210>22
[0871] <211>20

- [0872] <212>PRT
[0873] <213> 人
[0874] <220>
[0875] <221> 变体
[0876] <222>(4)..(4)
[0877] <223>Xaa 可以是 Gly 或 Ala
[0878] <220>
[0879] <221> 变体
[0880] <222>(6)..(6)
[0881] <223>Xaa 可以是 Ile 或 Asn
[0882] <220>
[0883] <221> 变体
[0884] <222>(8)..(8)
[0885] <223>Xaa 可以是 Ile 或 Leu
[0886] <220>
[0887] <221> 变体
[0888] <222>(9)..(9)
[0889] <223>Xaa 可以是 Phe 或 Ala
[0890] <220>
[0891] <221> 变体
[0892] <222>(11)..(11)
[0893] <223>Xaa 可以是 Thr 或 His
[0894] <220>
[0895] <221> 变体
[0896] <222>(12)..(12)
[0897] <223>Xaa 可以是 Ala 或 Thr
[0898] <220>
[0899] <221> 变体
[0900] <222>(13)..(13)
[0901] <223>Xaa 可以是 Asn 或 His
[0902] <400>22
[0903] Trp Met Gly Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Gln
[0904] 1 5 10 15
[0905] Lys Phe Gln Gly
[0906] 20
[0907] <210>23
[0908] <211>22
[0909] <212>PRT
[0910] <213> 人

- [0911] <220>
[0912] <221> 变体
[0913] <222>(10)..(10)
[0914] <223>Xaa 可以是 Ser 或 Thr
[0915] <220>
[0916] <221> 变体
[0917] <222>(11)..(11)
[0918] <223>Xaa 可以是 Gly 或 Asn
[0919] <220>
[0920] <221> 变体
[0921] <222>(13)..(13)
[0922] <223>Xaa 可以是 Ala 或 Thr
[0923] <220>
[0924] <221> 变体
[0925] <222>(15)..(15)
[0926] <223>Xaa 可以是 Gly、Ser 或 Thr
[0927] <220>
[0928] <221> 变体
[0929] <222>(19)..(19)
[0930] <223>Xaa 可以是 Ser 或 Gly
[0931] <400>23
[0932] Trp Val Ser Ser Ile Glu His Lys Trp Xaa Xaa Tyr Xaa Thr Xaa Tyr
[0933] 1 5 10 15
[0934] Ala Ala Xaa Val Lys Gly
[0935] 20
[0936] <210>24
[0937] <211>8
[0938] <212>PRT
[0939] <213> 人
[0940] <220>
[0941] <221> 变体
[0942] <222>(1)..(1)
[0943] <223>Xaa 可以是 His 或 Gln
[0944] <220>
[0945] <221> 变体
[0946] <222>(5)..(5)
[0947] <223>Xaa 可以是 Asp、Glu、Gln、Ser、Thr 或 Phe
[0948] <220>
[0949] <221> 变体

- [0950] <222>(6).. (6)
- [0951] <223>Xaa 可以是 Gln、Leu、Ile、His、Tyr 或 Phe
- [0952] <220>
- [0953] <221> 变体
- [0954] <222>(7).. (7)
- [0955] <223>Xaa 可以是 Trp、His、Ser 或 Pro
- [0956] <220>
- [0957] <221> 变体
- [0958] <222>(8).. (8)
- [0959] <223>Xaa 可以是 Ala、Gln、Val、Asn、Pro-Phe、Pro-Met、Ser-Phe
- [0960] <400>24
- [0961] Xaa Gln Tyr Ile Xaa Xaa Xaa Xaa
- [0962] 1 5
- [0963] <210>25
- [0964] <211>10
- [0965] <212>PRT
- [0966] <213> 人
- [0967] <220>
- [0968] <221> 变体
- [0969] <222>(2).. (2)
- [0970] <223>Xaa 可以是 Ser 或 Thr
- [0971] <220>
- [0972] <221> 变体
- [0973] <222>(4).. (4)
- [0974] <223>Xaa 可以是 Asp 或 Thr
- [0975] <220>
- [0976] <221> 变体
- [0977] <222>(5).. (5)
- [0978] <223>Xaa 可以是 Ala 或 Arg
- [0979] <220>
- [0980] <221> 变体
- [0981] <222>(6).. (6)
- [0982] <223>Xaa 可以是 Gln 或 Phe
- [0983] <220>
- [0984] <221> 变体
- [0985] <222>(9).. (9)
- [0986] <223>Xaa 可以是 Ala 或 Thr
- [0987] <220>
- [0988] <221> 变体

- [0989] <222>(10).. (10)
- [0990] <223>Xaa 可以是 Ala、Gly 或 Ser
- [0991] <400>25
- [0992] Gln Xaa Tyr Xaa Xaa Xaa Ser Ser Xaa Xaa
- [0993] 1 5 10
- [0994] <210>26
- [0995] <211>10
- [0996] <212>PRT
- [0997] <213> 人
- [0998] <220>
- [0999] <221> 变体
- [1000] <222>(2).. (2)
- [1001] <223>Xaa 可以是 Gly 或 Phe
- [1002] <220>
- [1003] <221> 变体
- [1004] <222>(5).. (5)
- [1005] <223>Xaa 可以是 Ser 或 Arg
- [1006] <220>
- [1007] <221> 变体
- [1008] <222>(9).. (9)
- [1009] <223>Xaa 可以是 Ile 或 Met
- [1010] <400>26
- [1011] Gly Xaa Thr Phe Xaa Ser Tyr Gly Xaa Ser
- [1012] 1 5 10
- [1013] <210>27
- [1014] <211>119
- [1015] <212>PRT
- [1016] <213> 人
- [1017] <220>
- [1018] <221> 构架 1
- [1019] <222>(1).. (25)
- [1020] <223>CDR3
- [1021] <220>
- [1022] <221>CDR1
- [1023] <222>(26).. (35)
- [1024] <223>CDR1
- [1025] <220>
- [1026] <221> 构架 2
- [1027] <222>(36).. (46)

- [1028] <223>CDR3
[1029] <220>
[1030] <221>CDR2
[1031] <222>(47)..(66)
[1032] <223>CDR2
[1033] <220>
[1034] <221> 构架 3
[1035] <222>(67)..(98)
[1036] <223>CDR3
[1037] <220>
[1038] <221>CDR3
[1039] <222>(99)..(108)
[1040] <223>CDR3
[1041] <220>
[1042] <221> 构架 4
[1043] <222>(109)..(119)
[1044] <223>CDR3
[1045] <400>27
[1046] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[1047] 1 5 10 15
[1048] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
[1049] 20 25 30
[1050] Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[1051] 35 40 45
[1052] Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
[1053] 50 55 60
[1054] Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
[1055] 65 70 75 80
[1056] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1057] 85 90 95
[1058] Ala Arg Tyr Asp Gly Ile Tyr Gly Glu Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
[1059] 100 105 110
[1060] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1061] 115
[1062] <210>28
[1063] <211>109
[1064] <212>PRT
[1065] <213> 人
[1066] <220>

- [1067] <221> 变体
[1068] <222> (1).. (1)
[1069] <223> Xaa 可以是 Asp 或 Glu
[1070] <220>
[1071] <221> 构架 1
[1072] <222> (1).. (23)
[1073] <223> VH1A
[1074] <220>
[1075] <221> MISC_FEATURE
[1076] <222> (24).. (35)
[1077] <223> CDR1
[1078] <220>
[1079] <221> 构架 2
[1080] <222> (36).. (46)
[1081] <223> VH1A
[1082] <220>
[1083] <221> MISC_FEATURE
[1084] <222> (47).. (57)
[1085] <223> CDR2
[1086] <220>
[1087] <221> 构架 3
[1088] <222> (58).. (89)
[1089] <223> VH1A
[1090] <220>
[1091] <221> MISC_FEATURE
[1092] <222> (90).. (97)
[1093] <223> CDR3
[1094] <220>
[1095] <221> 构架 4
[1096] <222> (98).. (109)
[1097] <223> VH1A
[1098] <400> 28
[1099] Xaa Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[1100] 1 5 10 15
[1101] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asp Ala
[1102] 20 25 30
[1103] Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
[1104] 35 40 45
[1105] Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

[1106]	50	55	60
[1107]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu		
[1108]	65	70	75 80
[1109]	Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Ile Gln Leu His		
[1110]	85	90	95
[1111]	Ser Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[1112]	100	105	